

Vol. X, No. 3.

April, 1929

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; NOFORU ARIYAMA, Niigata; KIKO GOTO, Kyoto; MOTONOSUKE GOTO, Fukuoka; KIKUNAE IKEDA, Tokyo; KATSUJI INOUE, Sendai; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHIKO KOIZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; KAORU OGURU, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; KENZO SUTO, Kanazawa; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUTAKA TERUUCHI, Tokyo; SHIGERU TODA, Hoten; MASAJI TOMITA, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIYOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

TOKYO

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY.

11 Ichome Kagacho, Ushigome.

Price { ¥10.00 per volume, Nippon.
\$ 5.50 per volume, other countries.

BEITRÄGE ZUR WIRKUNG DES INSULINS BEI GLEICHZEITIGER ANWENDUNG VON BLAUSÄURE.

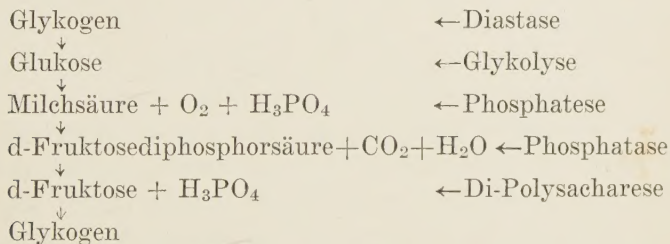
VON

NOBUO HOSODA.

(Aus der II. mediz. Klinik, Mediz. Akademie zu Osaka,
Vorstand: Prof. S. Kozawa.)

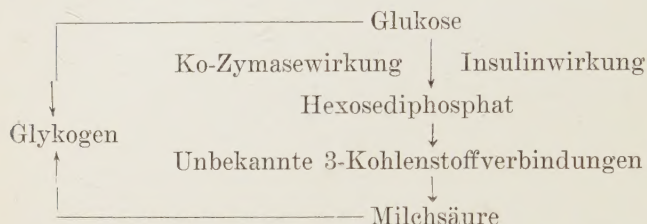
(Eingegangen am 24. Januar 1929)

Es ist eine feststehende Tatsache, dass Insulin den Blutzucker-
gehalt im Organismus herabsetzt. Was aber die Wirkungsmechanik
des Insulins anbetrifft, so ist dieselbe noch nicht genügend klar-
gestellt, obwohl zahlreiche Untersuchungen darüber von vielen
Autoren vorgenommen worden sind. Der Abbau der Kohlen-
hydrate im Muskel geht nach den mühsamen Arbeiten von
Meyerhof und Hill (1923) dem folgenden Schema entsprechend
vor sich:



Brugsch und seine Mitarbeiter (1925) haben zuerst ein-
gehend studiert, in welcher Weise Insulin sich an der chemischen
Umsetzung des Zuckers im Organismus, wie es Meyerhof betref-
fs der Muskeln festgestellt hat, beteilige, und sind zu der Auffassung
gelangt, dass Insulin eine Kinase sei, welche die Phosphatase d.h.
das einzige Atmungsferment eines oxydativ-synthetischen Vor-
ganges der Milchsäure über Hexosediphosphorsäure zu Glykogen,
aktiviere.

Virtanen (1926) kam auf Grund seiner Versuche über Milchsäuregärung zu der Ansicht, dass Insulin eine Ko-zymase sei, indem es den Zuckerabbau im Organismus fördert und die Zymophosphatbildung aktiviert. Schematisch lässt sich seine Auffassung folgenderweise ausdrücken.



Dagegen fanden Euler und Myrbäck (1925), dass Insulin bei Versuchen, die mit ko-fermentfrei gemachter Hefe angestellt wurden, seine eigentliche Wirkung nicht zu entfalten vermag. Doch vermochten sie nicht zu leugnen, dass irgendein Zusammenhang zwischen dem Insulin und dem Phosphatumsatz bestehe.

Andererseits ist bekannt, dass die Blausäure auch in minimaler Konzentration sowohl die Fermentwirkung als auch die Atmung des Organismus hemmt. Lipschitz (1920) stellte in Vitro fest, dass jene die Zellatmung zum Stillstand bringt. Nach Warburg (1921) soll die Zellatmung eine Eisenkatalyse sein, indem das im Gewebe vorhandene Eisen bei der Atmung die Hauptrolle spielt und durch die Blausäure in eine zur Sauerstoffübertragung unfähige Form übergeführt wird. Auch Ogata (1924) schloss auf Grund seiner Untersuchungen, dass die Blausäure bei der Atmung hauptsächlich die Sauerstoffverwertung der Zellen angreift.

Von der Tatsache ausgehend, dass Insulin und Blausäure gegen die Oxydation des Organismus eine entgegengesetzt Wirkung entfalten, hat J. Szolnoki (1926) seine Versuche unternommen und bemerkt, dass man bei einem 24 Stunden lang mit Cyanid schwer vergifteten Kaninchen durch eine subkutane Injektion mit Insulin dessen Atmung eine Zeitlang zu normaler Höhe wieder herzustellen im Stande ist.

Auch ich habe auf Anregung von Prof. Kozawa folgende Experimente vor dem Erscheinen der Szolnokischen Arbeit ausgeführt, um mich zu vergewissern, ob das Insulin die Phosphatase aktiviere, und ob das Insulin den Blutzuckerspiegel zu beeinflussen vermöge, wenn man die Blausäure gleichzeitig oder hintereinander appliziert.

METHODISCHES.

Als Versuchstiere verwendete ich gesunde Kaninchen, die vorher 24 Stunden lang dem Hunger ausgesetzt waren. Bei den Experimenten wurden das Insulin aus Toronto und 1%ige wässrige Lösung von Blausäure von Merck, die jederzeit frisch hergestellt wurde, immer subkutan injiziert.

Die Blutzuckerbestimmung geschah nach Folin und Wu, indem ich die Ohrvenen präparierte und das Blut in ein Reagenzrohr tropfen liess.

RESULTATE.

Meine Resultate sind zur Vereinfachung in Tabellen niedergelegt.

Fall 1 (2,5 Kg.)

Blutzuckergehalt vor und nach Injektionen von:

Stunden	Kontrolle		erst 0,55 ccm KCN; dann nach 15 Minuten 3,3 E.H. Insulin
	nur 0,55 ccm KCN (1%ige Lös.)	nur 3,3 E.H. Insulin	
vor d. Inj.	0,104 %	0,112 %	0,093 %
1 Std. nach d. Inj.	0,128	0,055	0,073
2 " "	0,134	0,064	0,055
3 " "	0,125	0,055	0,044
4 " "	0,124	0,054	0,070
5 " "	0,127	0,086	0,078
6 " "	0,126	0,112	0,094
7 " "	0,124	0,120	0,150
Bemerkung	Es traten keine merklichen Vergiftungssymptome ein.		

Ergebnisse: Cyankalium ruft Hyperglykämie, Insulin Hypoglykämie, und Cyankalium und dann 15 Minuten später injiziertes Insulin ebenfalls Hypoglykämie hervor.

Fall 2 (2,2 Kg.)

	Kontrolle		A	B	C
Stunden	0,7 cem KCN	3,3 E.H. Insulin	erst 0,6 cem KCN; nach 15 Minuten 3,3 E.H. Insulin	erst 3,3 E.H. Insulin nach 1 Stunde 0,6 cem KCN.	0,6 cem KCN; 3,3 E.H. Insulin gleichzeitig gebraucht.
vor d. Inj.	0,116	0,103	0,115	0,119	0,128
1 Std. nach d. Inj.	0,108	0,069	0,150	0,069	0,135
2 „ „	0,121	0,055	0,125	0,041	0,084
3 „ „		0,041	0,069	0,054	0,045
4 „ „	0,228	0,056	0,070	0,060	0,061
5 „ „	0,202	0,120	0,083	0,127	0,073
6 „ „	0,179	0,110	0,079	0,117	0,105
7 „ „	0,112	0,116	0,095	0,127	0,117
8 „ „	0,106		0,095	0,138	0,128
Bemerkung	heftiger Krampf 5 Minuten nach d. Injektion.		heftiger Krampf 10 Minuten nach d. KCN-Injektion.	kraftlos nach KCN-Injektion.	Krampf nach KCN-Injektion.

Ergebnisse: A. Ganz gleich wie I. Fall. B. Insulinhypoglykämie wird durch KCN wieder zur Norm, sogar zu etwas höherem Wert zurückgebracht. C. Bei gleichzeitigen Injektionen von Insulin und KCN tritt nur Insulinwirkung auf.

Fall 3 (2,5 Kg.)

Stunden	Kontrolle		A	B
	0,74 ccm KCN	3,8 E.H. Insulin	erst 0,6 ccm KCN ; nach 30 Minuten 3,8 E.H. Insulin	erst 3,8 E.H. Insulin nach 1 Stunde 0,65 ccm KCN.
vor d. Inj.	0,134	0,146	0,141	0,103
1 Std. nach d. Inj.	0,106	0,122	0,085	0,099
2 „ „	0,143	0,074	0,041	0,040
3 „ „	0,146	0,045	0,041	0,026
4 „ „	0,265	0,052	0,072	0,059
5 „ „	0,261	0,065		
6 „ „	0,262	0,075		
7 „ „	0,208	0,080		
Bemerkung	kraftlos 20 Minuten nach der Injektion.		kraftlos nach KCN-Injektion; heftiger Krampf 2½ Stunden nach Insulingabe und 20 ccm. 10%ige Traubenzuckerlös. subkutan gebraucht.	heftige Krämpfe 15 Minuten nach KCN-Injektion und 2 Stunden nach Insulin- injektion; 20 ccm. 10%ige Traubenzuckerlös. subkutan.

Ergebnis: Ganz gleich wie II. Fall.

Aus den oben beschriebenen Resultaten ersieht man, dass Blausäure im Organismus eine Erhöhung des Blutzuckergehaltes verursacht, die aber durch die Insulingabe nicht nur wieder zur Norm sondern auch weit tiefer herabgesetzt werden kann. Wenn das Insulin wirklich die Kinase der Phosphatase wäre, was Brugsch und seine Schüler behauptet haben, so könnte es keinen Einfluss auf die durch Blausäure hervorgerufene Hyperglykämie ausüben, weil die Phosphatase schon durch Blausäure vergiftet wäre.

Somit sehe ich mich zum Schluss veranlasst zu glauben, dass das Insulin im Einklang mit der Angabe von Euler und

Myrbäck, mit der Ko-zymase der Hexosediphosphatbildung nicht identisch sein kann.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Blausäureinjektion beim Kaninchen ruft Hyperglykämie hervor.

2. Die durch Blausäureinjektion verursachte Hyperglykämie kann durch Insulingabe wieder zur Norm oder noch tiefer herunter gedrückt werden, was man beim normalen Kaninchen beobachtet hat.

3. Auf Grund dieser Ergebnisse kann man wohl sagen, dass das Insulin nicht der Aktivator der Hexosediphosphatbildung ist.

LITERATUR.

- Brugsch und Horsters, (1925): *Biochem. Zeitschr.* **155**, 495.
Euler und Myrbäck, (1925): *Hoppe-Seylers' Zeitschr. f. physiolog. Chem.* **150**, 1.
Lipschitz, (1920): ebendasselbst **109**, 189.
Ogata, (1924): *Journal of biophysics.* **1**, 109.
Szolnoki, (1926): *Deutsche med. Wochenschr.* **34**, 1427.
Virtanen, (1926): ebendasselbst **171**, 76.
Warburg, (1921): *Biochem. Zeitschr.* **119**, 134.

EXPERIMENTELLE VERSUCHE ÜBER DAS BLUTAMMONIAK.

VON

SUGIZO KARAZAWA.

(Aus der II. medizinischen Klinik der med. Akademie zu Osaka.

Vorstand: Prof. S. Kozawa.)

(Eingegangen am 24. Januar 1929.)

Obgleich die Untersuchungen vieler Autoren über den Ammoniakgehalt im Blute von verschiedenartigen Tieren kurz nach einander erschienen sind, unterliegen doch die in der Literatur angegebenen Zahlen immer mehr oder weniger einer Schwankung, die je nach der Verschiedenheit der Bestimmungsmethode besonders ins Auge fallend ist.

Der Bequemlichkeit halber möchte ich die bisher publizierten Resultate in der Tabelle anführen.

Da der Ammoniakgehalt des Blutes der verschiedenen Tiere im normalen Zustande, wie die Tabelle zeigt, immer schwankend ist, so findet man ohne weiteres eine noch höhere Differenz unter pathologischen Verhältnissen; so beträgt er nach der Angabe von Nash und Benedict (1921) beim normalen Hunde 0,03–0,14 mg./dl und zeigt beim nephrectomierten einen noch niedrigeren Wert. Der Wert des Ammoniakgehaltes im Blute, welches den Nierenvenen entnommen ist, ist viel grösser als der im Blute aus dem anderen Kreislaufsystem desselben Tieres. Von dieser Tatsache ausgehend, haben sie behauptet, dass das Ammoniak zuerst in der Niere gebildet und dann im ganzen Körper circuliert wird.

Unter Berücksichtigung dieser Behauptung von Nash und Benedict, dass die Niere der Herd sein soll, wo die Ammoniakbildung stattfindet, hat Russel (1923) die Blutammoniakmenge im Blut von schweren Nephritikern mit hochgradiger Azothämie

TABELLE.

Nr.	Autorname.	Jahrg.	Tierarten.	Arterienblut.	Venenblut.	Gehaltmenge des Blut-ammoniaks.
1	Nencki und Zaleski.	1901	Hund.	Aorta.	Pfortader	0,28-0,3 mg/dl.
2	Horodynski, Salaskin u. Zaleski.	1902	Hund.	Aorta.	Pfortader	1,01-1,08 „
3	Folin.	1902-1903	Hund.	Aorta.		0,21-0,65 „
4	Wolf und Mariott.	1910	Rind.	Aorta.		1,01-2,44 „
5	Carlson u. Jacobson.	1909-1910	Katze.	Aorta.		0,5-0,6 „
6	Medwedew.	1911	Hund.	Aorta.		1,7-5,96 „
7	Folin und Denis.	1912	Katze.	Aorta.		1,57 „
					venöses Blut im Peritoneum des Dünndarms.	2,39 „
					venöses Blut im Peritoneum des Dickdarms.	0,47-0,64 „
					Pfortader	0,03-0,08 „
8	Mathews u. Miller.	1913	Hund.	Arterienblut.		0,05-0,77 „
9	Denis.	1913-1914	Fischblut.			0,44-1,60 „
10	Jacobson.	1914	Katze.	Arterienblut.		0,10-0,35 „
11	Rhode.	1915	Hund.	Arterienblut.		0,35 „
12	Gettler u. Baker.	1916	Mensch.			1,0-5,5 „
13	Bang.	1916	Kaninchen.			0,4-1,2 „
14	Henriques u. Hansen.	1917	Hund.			0,28-0,72 „
			Ziege			0,2-0,72 „
			Katze.	Arterienblut.	Venenblut.	0,4-1,1 „
			Kaninchen.	Arterienblut.		0,81-1,2 „
			Mensch.		Venenblut.	0,21-0,44 „
					Venenblut.	0,21-0,44 „
					Venenblut.	0,16-0,29 „
					Venenblut.	0,16 „
					Venenblut.	0,2-0,42 „
					Venenblut.	0,1-0,48 „
15	Morgulis u. Jahr.	1919	Mensch.		Venenblut.	0,14-0,3 „
16	Barnett.	1917	Mensch.		Venenblut.	entweder zeitweise negative Resultate oder 0,07-0,15 „

dem Blute Gesunder verglichen, aber mit keine nennenswerte Abweichung gefunden.

Henriques und Mitarbeiter (1917–18) haben im Gegensatz zu Nash und Benedict auch keine Abweichung zwischen der Ammoniakmenge im arteriellen und venösen Blute des Hundes konstatiert.

Parnas und Heller (1924) haben behauptet, dass Blutammoniak hauptsächlich aus roten Blutzellen und in sehr geringer Menge aus Blutserum stammen könnte, indem sie nachwiesen, dass das Ammoniak in Blut, welches man im Reagenzglas stehen lässt, sich allmählich vermehren kann.

Nach den vorstehenden Angaben erscheint es zweifelhaft, dass immer irgendein Zusammenhang zwischen dem Blutammoniak und der Niere besteht.

Seit einigen Jahren habe ich auch an der Untersuchung der Nierenfunktionen auf diesem Gebiete weiter gearbeitet und führe die da erhaltenen Befunde des Ammoniakgehaltes im Hundeblute in folgendem an.

METHODIK UND RESULTATE.

Die Bestimmungsmethode der Ammoniakmenge im Blute ist die nach Folin und Denis, wie auch Nash und Benedict sie benutzt haben. Als Versuchsanordnung habe ich zuerst zur Vergleichung das Ammoniak in normalem Hundeblute, welches aus Aorta, Halsvene, Vena cava inferior und Nierenvenen entnommen wurde, und dann in Blut aus Nierenvenen der linken entnervten (d.h. nach etwa 3 cm langen perivaskulären Neurektomie der Nierenarterie) und anderen gesunden Niere bestimmt.

Versuch I.

linkes Nierenvenenblut,	0,163 mg/dl.
rechtes Vorhofsblut,	0,127 mg/dl.

Versuch II.

Das Blut ist dem unteren Teile der Einmündungsstelle der Nierenvenen in der Vena cava inferior aufgenommen.

Vena cava inferior,	0,072 mg/dl.
Nierenvenen,	0,17 mg/dl.
Halsarterienblut,	0,037 mg/dl.
Bauchaortablut,	0,033 mg/dl.

Versuch III. Hund männl.

Blut aus Vena femoralis,	0,0283 mg/dl.
Halsarterienblut,	0,0297 mg/dl.
linksseitiges Nierenvenenblut,	0,1255 mg/dl.
Bauchaortablut,	0,045 mg/dl.

Versuch IV.

Das Blut wurde durch Laparotomie mit Hilfe einer Injektion von 25%iger Urethanlösung entnommen.

Nierenvenenblut,	0,116 mg/dl.
Blut aus Vena cava inferior,	0,08 mg/dl.
Bauchaortablut,	0,044 mg/dl.

Versuch V.

Zeitpunkt, 45 Tage nach der Entnervung der linken Niere.

Aortablut,	0,014 mg/dl.
Blut aus Vena cava inferior,	0,03 mg/dl.
Venöses Blut der rechten gesunden Niere,	0,138 mg/dl.
Venöses Blut der linken entnervten Niere,	0,235 mg/dl.

Versuch VI.

Laparotomie mit Morphin-narkose.

Halsarterienblut,	0,0175 mg/dl.
Blut aus Vena cava inferior,	0,065 mg/dl.
linksseitiges Nierenvenenblut,	0,186 mg/dl.

EPIKRISE.

Wie man aus den oben beschriebenen experimentellen Befunden über die Ammoniakmenge im Hundeblute ersieht, zeigt sich in allen Fällen, dass der Ammoniakgehalt im Nierenvenen-

blute der höchste, im anderen Venenblut der mittlere und im Aortenblute der geringste ist.

So fanden sich im Nierenvenenblute beim normalen Hunde die Ammoniakwerte von rund 0,116 bis 0,235 mg., im Körpervenenblute 0,0283 bis 0,08 mg. und im Aortenblute 0,014 bis 0,045 mg. in 100 cem. Blut. Diese Ziffer stimmt mit derjenigen von Nash und Benedict überein. Es ist eine interessante Tatsache, dass bei einem Hunde, der 45 Tage lang nach der Entnervung der linken Niere noch lebt, die Blutammoniakmenge aus den Venen der entnervten linken Niere ausserordentlich höher ist als die aus den anderen gesunden Nierenvenen.

SCHLUSS.

Der höchste Wert der Ammoniakmenge im Blute des Hundes findet sich im Nierenvenenblute und dann im Blute aus der Vena cava inferior, während das Blut aus der Aorta in der Regel eine geringere Menge von Ammoniak und das Halsarterienblut am wenigsten enthält.

LITERATUR.

- Bang, (1916): Biochemische Zeitschrift. **72**, 144.
Barnett, (1917): J. Biol. Chem. **29**, 459.
Carlson u. Jacobson, (1909): American Journ. of Physiol. **25**, 403.
Denis, (1913): J. Biol. Chem. **16**, 289.
Folin, (1902): Z. physiol. Chem. **37**, 161.
Folin u. Denis, (1912): Journ. of biol. chem. **11**, 161, 527.
Gettler u. Baker, (1916): Ebendasselbst. **25**, 211.
Henriques u. Hansen, (1917): Bioch. Z. **78**, 297.
" (1918): Ebendasselbst. **80**, 297.
Horodyski, Salaskin und Zaleski, (1902): Zeitschrift f. physiol. Chemie. **35**, 246.
Jacobson, (1914): J. Biol. Chem. **18**, 133.
Mathews u. Miller, (1913): Ebendasselbst. **15**, 87.
Medwede, (1911): Zeitschrift f. physiol. Chemie. **72**, 410.
Mongulis u. Jahr, (1919): Journ. of biol. chem. **38**, 435.
Nash u. Benedict, (1921): Ebendasselbst. **48**, 463.
Nenck und Zaleski, (1901): Zeitschrift f. physiol. Chemie. **33**, 193.

- Parnas u. Mitarbeiter (1924): Biochemische Zeitschrift. **152**, 1.
" (1925): " **155**, 247.
" (1925): " **159**, 298.
" (1926): " **169**, 255.
Rhode, (1915): Ebendasselbst. **21**, 325.
Russel, (1923): Biochem. journ. **17**, 72.
Wolff und Mariott, (1910): Biochem. Zeitschrift. **26**, 165.

ÜBER DIE WIRKUNG DER ELEKTROLYTEN AUF DIE GLYCEROPHOSPHATASE.

VON

KENTARO INOUE.

*(Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut der Medizinischen Akademie
zu Chiba. Direktor: Prof. S. Akamatsu.)*

(Eingegangen am 19. Dezember).

Über den Einfluss der Chemikalien auf die Glycerophosphatase aus *Aspergillus oryzae* habe ich schon voriges Jahr Bericht erstattet. Unter den Elektrolyten war die Wirkung des NaF eine auffallende. Es hemmt selbst in sehr verünnter Lösung die Fermentwirkung und schiebt das Ph-Optimum auffallenderweise zu der weniger sauren Reaktion. Die Wirkung der anderen Ionen war nicht deutlich. Jedenfalls schien der Versuch anzudeuten, dass dieses Ferment unter den Bedingungen seine optimale Wirkung in verschiedener Acidität ausüben kann. Kobayashi (1927) gelang es, das Ferment durch Adsorptionsmethode von einer Art Paralysator, der X-Substanz, zu befreien, und sah, dass das gereinigte Ferment nun das Optimum in weit mehr saurer Reaktion besitzt. Dieses Ergebnis wurde später von mir (1928) festgestellt. Wenn die X-Substanz vollständig weggenommen wird, wirkt nun das Ferment optimal bei Ph 2.8. Die Ph-Aktivitätskurve des Ferments zeigt nun eine typische Form, die Dissoziationskurve von Pk 4.8. Durch den Zusatz der X-Substanz kann das Optimum entlang dieser Kurve zu beliebiger Acidität verschoben werden. Das nicht gereinigte Ferment wirkt optimal bei Ph 5.6. Das gereinigte Ferment wird durch die äquivalente Menge der X-Substanz so beeinflusst, dass es bei Ph 5.6 wieder in den Besitz seines Optimums gelangt. Bei dieser Acidität wirkt das Ferment, sowohl frei von der X-Substanz als auch mit ihr zusammen, fast in gleichem Betrag. Jedenfalls bietet die umkehrbare Verschiebung des Optimums

innerhalb des so weiten Aciditätsbezirkcs grosses Interesse. Unsere X-Substanz weicht also in ihrer Wirkungsweise ein wenig ab von der Definition des Paralysators in der Fermentlehre. Seine Wirkung kommt zu Tage, ertens durch ihr relatives Mengenverhältnis zu dem Ferment und zweitens durch die Acidität des Mediums. Die beiden Momente sind untrennbar. Eine kleinere Menge der Substanz übt eine deutliche Hemmung bei einer Acidität aus, aber bei einer anderen Acidität kommt fast keine Beeinflussung zum Vorschein, selbst mit einer grösseren Menge. Die Wirkungen der Paralysatoren und auch der Aktivatoren, welche in der Fermentlehre und anderen biologischen Gebieten auseinander gesetzt wurden, sollen in Zukunft noch genauer studiert werden.

Die Wirkung der Chemikalien auf die Glycerophosphatase wurde nun mit dem gereinigten Ferment untersucht. Die Fermentlösung wurde in derselben Weise hergestellt, wie ich in der vorigen Mitteilung bei der Ermittlung der Ph-Aktivitätskurve angegeben habe.

Die Versuchsanordnung war wie folgt:

0,5% Glycerophosphat	25 cem
Puffer	10 cem
Wasser (oder Salzlösung)	5 cem
Fermentlösung	10 cem
	<hr/> 50 cem (+

Da die Aktivität der Fermentlösung, je nach dem Bedarf hergestellt, nicht durch die ganzen Versuche gleich war, wurde der Kontrollversuch bei jedem Protokolle angegeben. Man sieht im folgenden, dass die Fermentlösung jedesmal vollständig oder beinahe von Verunreinigungen befreit worden war.

Die Phosphorbestimmung wurde durch die ganzen Versuche nach Briggs ausgeführt. Die in den Protokollen angegebenen Zahlen bedeuten P in mg in 0,83 cem der Versuchslösungen. Ph elektrometrisch. Temperatur der Fermentversuche 37°C.

In den Versuchen über den Einfluss der Elektrolyte wurde die Wassermenge in der oben erwähnten Versuchslösung durch dasselbe Volum der Salzlösung ersetzt. Die Acidität wurde selbstverständlich in dem ganzen Gemisch nach der Anstellung jedes Versuches bestimmt.

Versuch 1.

Die Wirkung des Fluorids wurde zuerst untersucht, weil das Salz bei dem nicht gereinigten Fermente überhaupt einen stark hemmenden Einfluss ausübte. In dem vorliegenden Versuch war die Konzentration des Zusatzes zuerst 0,00625 Mol.

Anorg. Phosphor in mg.

Ph \ Zeit	½ Std.	1 Std.	2 Std.
2,62	0,00000	0,00000	0,00000
5,14	0,00314	0,00465	0,00800

Der als Kontrolle angestellte Versuch ergab folgendes Resultat :

Anorg. Phosphor in mg.

Ph \ Zeit	½ Std.	1 Std.	2 Std.
3,74	0,0250	0,0450	0,0800
4,75	0,0148	0,0253	0,0460
5,51	0,0061	0,0117	0,0263

Aus dem Hauptversuch ersieht man, dass bei Ph 2,62 das Ferment nicht mehr wirkt, dass aber bei Ph 5,14 seine Wirkung, obwohl bedeutend gehemmt, doch vorhanden ist. Es lässt uns an die Wirkung des Paralysators, der X-Substanz, denken. Aber die

Hemmungsweise des Fluorions ist etwas anders, wie es in den folgenden Versuchen mit derselben Fermentlösung veranschaulicht wird.

Versuch 2.

Die Konzentration des zu zusetzenden NaF wurde zu $\frac{1}{5}$ verringert; 0,00125 Mol.

Anorg. Phosphor in mg.			
Ph \ Zeit	$\frac{1}{2}$ Std.	1 Std.	2 Std.
2,52	0,0034	0,0066	0,0123
4,01	0,0014	0,0028	0,0055
5,37	0,0036	0,0071	0,0130
5,88	0,0052	0,0100	0,0186
6,27	0,0028	0,0055	0,0106

Im Gegensatz zu dem vorigen Versuch sieht man ausser der besseren Wirkung der Phosphatase noch das auffallende Ergebnis, dass die Phosphorsäureabspaltung bei Ph 2,53 einen höheren Betrag als bei Ph 4,01 erreicht hat. Das Verhältnis ist noch klarer geworden, als die Konzentration des Fluorions noch verdünnt wurde, nämlich 0,00063 Mol.

Versuch. 3.

Durch die Verminderung des Fluoridzusatzes wurde der Hemmungseinfluss, obwohl noch gut vorhanden, doch etwas verringert. Das war schon aus der zufällig mit dem vorigen Versuch übereinstimmenden Acidität, Ph 5,37, ersichtlich. Die Wirkung bei Ph 2,69 nahm aber enorm zu, und das Ferment wirkte in dieser Acidität weit besser als bei Ph 3,39 und sogar bei Ph 5,70. Es

0,00063 Mol. NaF		Anorg. Phosphor in mg.		
Ph	Zeit	½ Std.	1 Std.	2 Std.
	2,69	0,0127	0,0224	0,0411
	3,27	0,0045	0,0093	0,0179
	3,39	0,0039	0,0074	0,0157
	4,37	0,0046	0,0093	0,0179
	5,36	0,0059	0,0120	0,0228
	5,70	0,0071	0,0125	0,0240

traten also in diesem Fall unter der NaF-Wirkung deutlich 2 Optima hervor.

Versuch 4.

Die Wirkung des Sulfations war auch interessant. Bei dem unbehandelten Ferment in der vorigen Mitteilung habe ich keinen merklichen Einfluss beobachtet.

Bei dem gereinigten Ferment war der Vorgang ein anderer. Eine eigentümliche Hemmung wurde beobachtet, und seine Wirkungsweise war ähnlich dem fraglichen Paralysator, der X-Substanz, in der vorigen Mitteilung.

Bei Ph 5,2–5,3 sieht man in sämtlichen Fällen mit verschiedenem Zusatz von Na_2SO_4 fast den gleichen Betrag der Phosphorsäureabspaltung. Die Wirkung des Sulfations zeigte sich in der mehr sauren Reaktion. In Ph 3,4–3,5 wurde die Hydrolyse, je nach der steigenden Konzentration des Sulfations, immer mehr herabgesetzt.

Was die endliche Konzentration des Sulfates betrifft, ist sie zehnmal dünner als die in den Protokollen angegebenen. Das Ferment wirkt in der 0,05 Mol. Konzentration von Na_2SO_4 bei Ph 3,35 weniger als bei Ph 5,26. Schliesslich war bei der 0,02 Mol. Konzentration die Fermentwirkung in beiden Aciditäten beinahe

Na ₂ SO ₄	Ph	½ Std.	1 Std.	2 Std.
0,5 Mol.	2,80	0,0073	0,0146	0,0276
	3,35	0,0113	0,0210	0,0376
	5,26	0,0042	0,0083	0,0164
0,2 Mol.	3,50	0,0108	0,0209	0,0377
	5,33	0,0118	0,0221	0,0393
0,1 Mol.	3,41	0,0172	0,0355	0,0660
	5,33	0,0115	0,0218	0,0396
0,01 Mol.	3,41	0,0211	0,0425	0,0730
	5,33	0,0121	0,0220	0,0407
<hr/>				
	Ph	½ Std.	1 Std.	2 Std.
Kontrolle	3,41	0,0302	0,0582	0,0916
	5,33	0,0118	0,0226	0,0406

gleich. Das Ph-Optimum scheint zwischen diesen beiden Ph vorhanden zu sein. Aber bei der herabgesetzten Konzentration des Natriumsulfates, nämlich 0,01 und 0,001 Mol., wirkte das Ferment in Ph 3,4 weit besser als in Ph 5,3. Nach diesem Ergebnis kann man die Lage des Ph-Optimums nicht genau angeben, aber man darf wohl annehmen, dass sie, je verdünnter die Sulfatkonzentration war, sich desto mehr zu der sauren Reaktion verschob. Das war auch der Fall bei der früher untersuchten X-Substanz. In diesem Punkt stimmte die Sulfatwirkung mit dem Fluor überein, aber die Verschiedenheit bestand darin, dass das letzt genannte Ion in der weit verdünnten Konzentration genug effectiv war und

sich in der hohen Acidität, wie Ph 2,7, ein zweites Optimum zeigen liess, als seine Konzentration noch stark verdünnt und nicht hinreichte, um die allgemeine Hemmung auszuüben.

Versuch 5.

Durch Oxalat wurde die optimale Acidität auch zu der weniger sauren Reaktion verschoben.

Oxalat	Ph \ Zeit	1½ Std.	1 Std.	2 Std.
0,2 Mol.	3,77	Spur	0,00424	0,00820
	5,58	0,00785	0,0157	0,0282
0,02 Mol.	3,77	0,0108	0,0185	0,0378
	5,58	0,0093	0,0185	0,0348
0,002 Mol.	3,77	0,0255	0,0495	0,0783
	5,58	0,0082	0,0165	0,0295
Kontrolle	3,77	0,0307	0,0524	0,0985
	5,56	0,0080	0,0175	0,0325

Soweit ich untersuchte, konnten keine Einflüsse durch Kaliumchlorid (0,2 Mol.), Calciumchlorid (0,2 Mol.), Eisenchlorid (0,2 Mol.), Natriumnitrat (0,2 Mol.), Natriumnitrit (0,02 Mol.), Natriumarsenat (M/20), Borsäure (0,01 Mol.) und Glycerin (80%) veranschaulicht werden. Ph wurde colorimetrisch ermittelt, als bei den Arten der Salze die elektrische Methode versagte.

Die hier angegebene Konzentration der Chemikalien bedeutete die der zugesetzten Lösung, und in den Versuchslösungen war jede Konzentration auf das 10 fache verdünnt.

Bezüglich der fehlenden Hemmung des Phosphations wurde schon früher eine Untersuchung angestellt.

Versuch 6.

Kabayashi hat die Natur der Glycerophosphatase auf *Aspergillus oryzae* als Ampholyte bezeichnet. Die elektrochemische Natur des Ferments könnte aber nicht bloss von dem Ferment selbst, sondern auch von dem damit durch Adsorption verbundenen Stoff bedingt sein. Die typische Ph-Aktivitätskurve, welche ich bei diesem Ferment erreichte, und deren Dissoziationskonstante ich als P_k 4,8 bezeichnet habe, und die anodische Wanderung des Ferments in dem elektrischen Felde, welche von Kobayashi beobachtet und auch von mir bestätigt wurde, könnten darum nur einer zufälligen Beimengung zugeschrieben werden, die mit dem Ferment eine Adsorptionsverbindung herstellt. Es war aber wirklich nicht der Fall, wie der folgende Versuch ergibt.

Ich habe das gereinigte Ferment auf Glycerophosphat bei Anwesenheit von Eiweisse einwirken lassen. Die Eiweisslösung wurde durch das Lösen des Eiereiweisses aus einem Hühnerei in 200 ccm physiologischer Kochsalzlösung und Filtration hergestellt. Versuchsanordnung wie oben.

Kontrolle.				Bei Eiweisszusatz.			
Ph	Zeit	1 Std.	2 Stdn.	Ph	Zeit	1 Std.	2 Stdn.
2,63		0,092	0,140	2,88		0,087	0,144
3,60		0,080	0,125	3,77		0,079	0,127
4,93		0,043	0,079	4,79		0,053	0,086
5,90		0,025	0,037	5,99		0,020	0,035

Das Experiment ergab, dass die Abspaltung des Phosphors von der Anwesenheit des Eiweisses ganz unabhängig war, und zwar, dass sowohl die Lage des Optimums als auch die Fermentaktivität in variierender Wasserstoffzahl keine Differenz gegen den

gleichzeitig ohne Eiweisszusatz ausgeführten Versuch zeigten. Es wurde selbstverständlich vorher festgestellt, dass die Eiweisslösung weder eine Glycerophosphatase noch eine von unserer Phosphatase abspaltbare organischgebundene Phosphorsäure enthielt.

Trotz der indifferenten Wirkung des Eiweisses ergab sich durch Kataphoresenversuch, dass das Ferment an das Eiweisskolloidteilchen adsorbiert vorhanden war. Überführungsapparat von Kobayashi. Das gereinigte Ferment selbst wandert bei Ph 3,75 und Ph 5,50 immer anodisch, wie Kobayashi (1928) angegeben hatte, aber als es der Eiweisslösung beigemischt wurde, kehrte sich der Wanderungssinn ganz um. Das Ferment war unter solchen schwach sauren Reaktionen ausschliesslich in dem Raum der Kathodenseite nachzuweisen, und erst in alkalischer Reaktion wurde die anodische Wanderung beobachtet. Das Ferment war also an das Eiweiss adsorbiert gewesen und mit ihm zusammen übergeführt. Wo das Ferment nach Kataphorese vorhanden war, da wurde das Eiweiss durch Trichloressigsäure nachgewiesen und wo nicht, da war kein Eiweiss. Man kann aus dem Ergebnis wohl schliessen, dass die elektrochemische Natur der gereinigten Glycerophosphatase, die uns ihre Ph-Aktivitätskurve anzeigt, nicht von irgend einem beigemengten Stoff, sondern von dem Aufbaubestandteil des Ferments bedingt ist.

Nach der Angabe von Kobayashi ist die X-Substanz, der Paralytiker, dialysierbar, kochbeständig und mit Blei fällbar, aber sie verträgt Veraschung nicht. Ich habe die Mittelkammer des Elektrodialysenapparats von Pauli mit der X-Substanzlösung und die seitlichen Elektrodenräume mit destilliertem Wasser gefüllt und durch das System elektrischen Strom geleitet. Die Elektrodenflüssigkeiten mussten dabei zeitweise mit destilliertem Wasser vertauscht werden, um dem Bruch des Pergamentpapiers durch entstandene Säure oder Alkali vorzubeugen.

Die gesammelte Elektrodenflüssigkeit an den beiden Polen wurde neutralisiert mit HCl oder NaOH und auf das Volum der Mittelkammer konzentriert. Bei dem Versuch mit den elektro-

dialysierten Lösungen wurde die Wirkung der X-Substanz nur in der Anodenflüssigkeit beobachtet. Es wurde dadurch festgestellt, dass die aktive Substanz in der Lösung negativ geladen war und ihrer elektrochemischen Natur nach mit dem oben erwähnten Fluor, Oxalat, Sulfation zu derselben Gruppe gehörte. Die Analyse der Anodenlösung ergab eine gute Menge Phosphat- und Chlorion, aber nur eine Spur Sulfat- und Nitrition.

Kobayashi deutete die Wirkung der X-Substanz als Salzbildung zwischen dieser Substanz und der basischen Gruppe des Fermentampholyten. Die Wirkung der oben erwähnten Salze kann auch analog erklärt werden. Es ist ein spezifischer Fall von dem Dissoziationszustand des Ampholyten bei wirklicher Salzbildung, der von Michaelis (1922) beschrieben wurde. Wir bezeichnen mit

- [A]Die Gesamtkonzentration des Fermentampholyten;
 [a⁺] und [a⁻] ..Die Konzentration der als Kation resp. Anion dissoziierten Ionen desselben;
 [a]Die Konzentration der freien undissoziierten Fermentmoleküle;
 [s]Die Konzentration des Salzes, welches der Ampholyt als Base mit dem Elektrolytenanion bildet;
 K_sDie Dissoziationskonstante des Salzes;
 K_a und K_bDie beiden Dissoziationskonstanten des Fermentampholyten als Säure und Base;
 [i⁻]Die Konzentration des Anions des zugesetzten Elektrolyten.

Die Definition und das Massewirkungsgesetz erfordern;

$$\begin{aligned}
 [a^-] \cdot [H^+] &= K_a \cdot [a] \\
 [a^+] \cdot [OH^-] &= K_b \cdot [a] \\
 [a^+] \cdot [i^-] &= K_s \cdot [s] \\
 [a] + [a^+] + [a^-] + [s] &= [S] \\
 [H^+] [OH^-] &= K_w
 \end{aligned}$$

Dissoziationsrestgrad ist also

$$\frac{[a]}{[A]} = \rho = \frac{1}{1 + \frac{K_a}{[H^+]} + \frac{K_b \cdot [H^+]}{K_w} \cdot \left(1 + \frac{[i^-]}{K_s}\right)}$$

Die Dissoziationsrestkurve des Ampholyten wird nun so modifiziert, als ob die Kationdissoziationskonstante auf $\left(1 + \frac{[i^-]}{K_s}\right)$ vergrößert würde. Die Aniondissoziationskonstante bleibt unverändert. Es gibt keine wahre Salzbildung zwischen dem Ampholytenanion und dem Kation des zugesetzten Elektrolyten.

Mit der Zunahme des Zusatzes wird der Factor $\left(1 + \frac{[i^-]}{K_s}\right)$ vergrößert, und daher kommt es, dass die Lage des maximalen Dissoziationsgrades immer nach der weniger sauren Reaktion verschoben und die Höhe des Maximums dementsprechend herabgesetzt wird.

Den typischen Fall hat man bei Sulfat gesehen. Bei dem Fluorid war das Verhältnis nicht so einfach. Ich möchte aber auch bei dem Fluor prinzipiell dieselbe Wirkungsweise wie beim Sulfat annehmen. Der Unterschied war ausschliesslich bei Ph 2,6–3,5 vorhanden. In dieser Acidität wurde die Fermentwirkung durch Sulfatzusatz immer stärker herabgesetzt, dagegen durch Fluor nicht so beträchtlich, wie es in ein wenig verminderter Acidität der Fall war. Diese Beschränkung des hemmenden Einflusses der Fluornatriums soll sich auf die relativ schwache Säurenatur der Fluorwasserstoffsäure beziehen. Die Zunahme der Wasserstoffzahl soll die Dissoziation der in der Lösung gleichzeitig gebildeten Fluorwasserstoffsäure hemmen und folglich die Verminderung des Fluorions verursachen. Daraus folgt, dass die Fluorwirkung in solcher Acidität nur gemäss dem Bruchteil der zugesetzten Menge zu Tage kommt.

Nach Michaelis wird die Lage des isoelektrischen Punktes durch diese wahre Salzbildung aber nicht verändert. Es war auch der Fall bei dem Überführungsversuch bei dem mit NaF

gemischten Ferment. Die anodische Wanderung der Glycerophosphatase wurde durch NaF nicht verändert.

Versuch 7.

Die hemmende Wirkung des Fluorions habe ich schon in der vorigen Mitteilung angegeben. Es wurde dabei beobachtet, dass dieses Ion nicht nur in sehr verdünnter Konzentration wirksam war, sondern auf das Ferment schädigend wirken musste. Die Entfernung des Fluorions durch den Zusatz von überschüssigem CaCl_2 rief die Fermentwirkung nicht wieder hervor.

Die spezifische Wirkung des Sulfat- und Oxalations kann aber durch Kalkzusatz aufgehoben werden. Das für den Oxalatversuch gebrauchte Ferment zeigte folgende Wirkung:

0,5% Natriumglycerophosphat.	25 cem
Puffer	10 cem
Wasser	5 cem
Fermentlösung	10 cem

Ph \ Zeit	½ Std.	1 Std.	2 Std.
3,37	0,0283	0,0412	0,0864
5,26	0,0107	0,0186	0,0340

Wie erwähnt, wird die Fermentwirkung durch Zusatz mit Sulfat und Oxalat so beeinflusst, dass die Phosphorabspaltung in der mehr sauren Reaktion, also in der Nähe der eigentlichen optimalen Acidität, stark unterdrückt wird. Der Versuch mit der vorliegenden Fermentlösung war wie folgt:

0,5% Glycerophosphat	20 cem
Puffer	10 cem
0,2 Mol. Oxalat	5 cem
Wasser	5 cem
Fermentlösung	10 cem

Ph \ Zeit	½ Std.	1 Std.	2 Std.
3,29	0,0025	0,0045	0,0054
4,96	0,0079	0,0154	0,0248

In dem nächsten Ansatz wurde die Fermentlösung mit Oxalat und Puffer zusammen zuerst auf 37°C vorerwärmt und dann mit der gemischen Lösung von Glycerophosphat und Calciumchlorid versetzt. Der entstandene Niederschlag wurde gleich abfiltriert, und an dem klaren Filtrat wurde die Ph-Bestimmung und der Fermentversuch wie üblich ausgeführt.

A	{ 0,5% Glycerophosphat	20 cem
	{ 0,2 Mol. CaCl ₂	5 cem
B	{ Fermentlösung	10 cem
	{ 0,2 Mol. Oxalat	5 cem
	{ Puffer	10 cem

Ph \ Zeit	4 Std.
3,51	0,1000
5,59	0,0425

Ein analoges Resultat wurde bei Sulfat (0,5 Mol.) beobachtet. Die Konzentration des zugesetzten CaCl₂ war 3 Mol.

Ph \ Zeit	½ Std.	1 Std.	2 Stdn.
3,33	0,0134	0,0238	0,0422
5,46	0,0091	0,0149	0,0250

Soweit ich untersuchte, beschränkte sich die eigentümlich hemmende Wirkung auf Fluor, Oxalat und Sulfation. Diese

Ionen sind uns schon bekannt als Antikoagulant des Fibrinogens, und sie sollen dabei Calciumion zu einem unlöslichen Salz führen oder entionisieren. Es ist von theoretischem Interesse, dass die oben erwähnten Ionen auf die Glycerophosphatase und auf die Blutgerinnung einen hemmenden Einfluss ausüben können.

Meine Fermentlösung war, wie erwähnt, durch Adsorption und Elution hergestellt und gegen destilliertes Wasser genügend dialysiert. Ihr Kalkgehalt braucht fast nicht berücksichtigt zu werden. Trotzdem konnte die hemmende Wirkung der oben erwähnten Salze dadurch verursacht werden, dass diese, wie es bei der Blutgerinnung angenommen wird, auf das noch eventuell spärlich vorhandene Calciumion entionisierend wirken.

Diese Annahme der Kalkentziehung lässt sich aber andererseits nicht mit der Tatsache vereinen, dass die hemmende Wirkung jener Ionen bei verschiedener Acidität nicht in demselben Grad zu Tage kommt; es scheint dies sogar, wie oben diskutiert, meist von einem bestimmten Gesetzes beherrscht zu werden. Es wurde sogar oft beobachtet, dass die Glycerophosphatase beim Zusatz jener Salze nun bei Ph 5,6 weit wirksamer als bei Ph 3, der eigentlichen optimalen Acidität des gereinigten Ferments ist, aber bei der erst genannten Acidität durch den Zusatz fast gar nicht beeinflusst werden konnte.

Ich habe ausserdem die gereinigten Fermente im Apparat von Pauli elektrodialysiert. Das so behandelte Ferment wirkte wie früher bei Ph 3 optimal.

Dieses Resultat zeigt auch, dass die das Optimum verschiebende Wirkung der oben erwähnten Ionen nicht der Kalkentziehung zugeschrieben werden kann.

LITERATUR.

Kobayashi, H., (1927): J. Biochem. 8, 205.

Kobayashi, H., (1928): J. Biochem. 10, 147.

Inouye, K., (1927): J. Biochem. 7, 433.

Inouye, K., (1928): J. Biochem. 10, 133.

Michaelis, L., (1922): Die Wasserstoffionenkonzentration, 2 Aufl.

STUDIES ON THE BEHAVIOUR OF CHOLESTEROL WITHIN THE ANIMAL BODY.

II. The content of free and ester cholesterol in various tissues of normal rabbit.

By

JINYE ONIZAWA.

*(From the Biochemical Institute, Tokyo Imperial University.
Director: Prof. Samuro Kakiuchi.)*

(Received for publication, December 28, 1928.)

To elucidate the behaviour of cholesterol within the animal body the normal distribution of cholesterol must first be determined. As it has become clear that the biochemical significance of free and of ester cholesterol is entirely different there is no point in determining the total amount of cholesterol only, and it is vitally important to estimate the content of free and ester cholesterol separately.

The animals used in this experiment were all male rabbits weighing from 2000 to 2500 gm. Previous to the experiment these animals were fed on Okara and green vegetables for a week, followed by 24 hours fasting. Then all the blood vessels were washed out by injecting 0.85% saline solution through the central cut end of the Jugular vein, until the washing fluid ran out colourless from the peripheral out end. Each tissue was taken out, separated from connective tissue, freed as completely as possible from the adhering saline solution by means of filter paper and weighed in a beaker covered with a watch glass as exact to the reading of 1 mg. The procedure of determination reported in the previous communication was followed. The organs or tissues examined are the entire brain, lung, testicle, kidney, liver, spleen, suprarenal gland, heart muscle, red and white skeletal muscle, diaphragm, skin, whole blood and blood plasma.

TABLE I.

Organ or tissue	Number of experiments	Amount of free cholesterol			Amount of ester cholesterol				
		Average	Range of variation	Max. deviation	Average	Range of deviation	Ester/free	% for total cholesterol	Max. deviation
Total brain	5	2.183	2.282-2.090	% 4.52	% 0.014	% 0.057-undet.	0.0064	0.52	% 307.5
Lung	7	0.439	0.478-0.398	9.35	0.0073	0.022-undet.	0.0170	1.62	201.0
Heart muscle	6	0.101	0.110-0.092	8.92	0.0060	0.014-undet.	0.0590	5.95	133.0
Red muscle	5	0.0578	0.0795-0.044	37.50	0.0045	0.017-undet.	0.078	6.30	278.0
White muscle	6	0.0487	0.0590-0.045	21.20	0.0054	0.012-undet.	0.111	7.60	122.0
Diaphragm	3	0.0550	0.0690-0.048	25.50	0.022	0.030-0.014	0.399	28.84	36.3
Testicle	5	0.204	0.234-0.162	20.60	0.028	0.079-0.006	0.137	10.68	182.0
Kidney	6	0.310	0.327-0.276	11.00	0.051	0.142-undet.	0.164	13.66	178.5
Total blood	8	0.0632	0.0745-0.048	23.8	0.0199	0.0285-0.0107	0.331	24.90	46.2
Blood plasma	11	0.0161	0.0260-0.0085	61.0	0.0291	0.0540-0.0135	1.810	64.50	85.6
Skin	5	0.109	0.116-0.099	9.18	0.0260	0.0360-0.0140	0.238	19.00	46.20
Spleen	6	0.244	0.286-0.195	20.0	0.094	0.125-0.067	0.385	29.12	33.00
Liver	7	0.195	0.233-0.162	19.5	0.064	0.111-0.039	0.328	24.17	73.50
Suprarenal gland	5	0.450	0.812-0.232	80.5	6.468	7.720-5.060	14.38	93.52	21.75

The results of the determination are given in table I.

We can see from the table the following facts.

1. The content of free cholesterol remains almost constant in many kinds of tissues. Even in a few tissues, where the variation is much larger, the degree of variation is always smaller than that of ester cholesterol. The only exception is found in the suprarenal gland where the variation of free cholesterol is much larger than that of ester cholesterol.

2. The amount of ester cholesterol contained in normal tissue has a wide range of variation.

We note however that some organs or tissues are always rich in ester cholesterol, while the others are almost lacking in it. In the following the names of tissues are given in the order of their amount of ester cholesterol. Suprarenal gland (6.5%), spleen (0.09%), liver (0.06%), kidney (0.05%), skin (0.03%), testicles (0.03%), diaphragm (0.02%), brain (0.01%), lung (0.01%), heart muscle (0.01%).

Over 5% : Suprarenal gland.

Over 0.05% : Spleen, liver, kidney.

Over 0.01% : Skin, testicles, diaphragm, brain.

Under 0.01% : Lung and heart muscle.

3. The variations of both free and ester cholesterol are especially great in blood plasma. It may be noted in passing that the content of cholesterol, both free and ester, is larger in Autumn and Winter than in Spring and Summer. The amount of free and ester cholesterol runs parallel with each other in these variations.

REFERENCE.

Onizawa, J. (1928): *The Journal of Biochem.*, **10**, 45.

STUDIES ON THE BEHAVIOUR OF CHOLESTEROL WITHIN THE ANIMAL BODY.

III. The influence of various autonomous nervous poisons on the content of cholesterol in each organ and tissue.

By

JINYE ONIZAWA.

*(From the Biochemical Institute, Tokyo Imperial University.
Director: Prof. Samuro Kakiuchi.)*

(Received for publication, December 28, 1928.)

That the autonomous nerve system plays an important rôle in many kinds of metabolic change such as urea formation, sugar mobilisation and others are known and it is highly probable that they may participate also in the metabolic change of fatty stuffs. Morita found in his investigation on the lipin distribution within the body under normal and various conditions that the successive adrenalin injection decreased the cholesterol content in the suprarenal gland in a large degree, while its content in other tissues remained almost constant. He determined only the total amount of cholesterol and did not discriminate between that of free and ester cholesterol. Because of the reason, however, that free cholesterol is quite different in its biological meaning from ester cholesterol, as is shown by Tsuneyoshi (1927), it is interesting to know the amount of free and ester cholesterol under these circumstances. I have therefore undertaken to estimate the content of free and ester cholesterol in various tissues under normal conditions on the one hand and repeated adrenalin injection on the other. My investigation was also extended to see the effect of ergotoxin, pilocarpin and atropin. In the following pages the result of these experiments is given.

I. ADRENALIN.

1/1000 solution of adrenalin (Sankyo) was injected sub-

cutaneously into the animal in an amount of 0.5 mg. per Kilo body weight every day for a week. 2 hours after the last injection a sample of blood was collected for determination and the blood vessel was washed out quickly with 0.85% saline solution as described in the foregoing section and each organ and tissue was subjected to the estimation of free and total cholesterol. The results are given in table II.

TABLE II.

Content of free and ester cholesterol in various kinds of organs and tissues after the repeated injection. The amount is given by referring to wet tissue:

Adrenalin. (Average of three animals).

Organ or tissue	Free cholesterol				Ester cholesterol			
	Normal	Amount observed	Amount increased	Percentage increase	Normal	Amount observed	Amount increased	Percentage increase
Brain	2.183	2.589	+0.406	+18.60	0.914	—	-0.014	-100.0
Lung	0.439	0.430	-0.009	-2.05	0.0073	—	-0.0073	-100.0
Heart muscle	0.101	0.147	+0.046	+45.50	0.006	—	-0.006	-100.00
Diaphragm	0.055	0.088	+0.033	+60.00	0.022	0.0075	-0.0145	-65.90
Red muscle	0.058	0.076	+0.028	+31.30	0.0036	0.0004	-0.0032	-91.20
White muscle	0.049	0.057	+0.008	+16.80	0.0054	0.0034	-0.0020	-37.10
Testicle	0.204	0.244	+0.040	+19.90	0.028	0.049	+0.021	+75.00
Kidney	0.310	0.377	+0.067	+21.60	0.053	0.040	-0.013	-24.50
Total blood	0.0602	0.0798	+0.0196	+32.50	0.0199	0.0220	+0.0021	+9.54
Blood plasma	0.9161	0.0236	+0.0075	+46.66	0.0291	0.0327	+0.0036	+11.00
Skin	0.109	0.159	+0.050	+45.80	0.026	0.010	-0.016	-61.50
Spleen	0.244	0.434	+0.190	+77.80	0.094	0.018	-0.076	-80.90
Liver	0.195	0.260	+0.065	+33.38	0.064	0.024	-0.040	-62.50
Suprarenal gland	0.450	0.559	+0.109	+24.20	6.485	2.907	-3.579	-55.00

As can be seen from the table, the injection of adrenalin induces quite obviously the increase of free cholesterol in every kind of tissue. Among the muscular tissues, the increase is the

largest in the heart muscle and diaphragm, next in the red skeletal muscle, and the white muscle is the least influenced one in muscular tissue. A very striking thing observed is that the lung is always enlarged after a repeated adrenalin injection with increased amount of cholesterol. The percentage of cholesterol, however, remained almost the same.

The amount of ester cholesterol is decreased in all tissues, except testicles and blood. The decrease is especially noted in the suprarenal gland, liver and spleen.

II. ERGOTOXIN.

Ergotoxin (Merck) was used as 1 per cent solution, and was injected in an amount of 4.0 mg. per Kilo body weight. The

TABLE III.
Ergotoxin. (Average of three animals.)

Organ or tissue	Free cholesterol				Ester cholesterol			
	Normal	Amount observed	Amount increased	Percentage increase	Normal	Amount observed	Amount increased	Percentage increase
	%	%	%	%	%	%	%	%
Brain	2.183	2.250	+0.067	+ 3.07	0.014	0.0423	+0.0283	+202.0
Lung	0.439	0.499	+0.060	+16.05	0.0073	—	—0.0073	—100.0
Heart muscle	0.101	0.113	+0.012	+11.90	0.006	0.0177	+0.0171	+195.0
Diaphragm	0.055	0.0632	+0.0082	+14.90	0.022	0.0110	—0.011	— 50.0
Red muscle	0.058	0.0596	+0.0016	+ 3.10	0.0036	0.0148	+0.0112	+229.0
White muscle	0.049	0.054	+0.005	+10.90	0.0034	0.0041	—0.0013	— 24.10
Testicle	0.204	0.244	+0.040	+19.60	0.028	0.028	—	—
Kidney	0.310	0.392	+0.082	+26.42	0.053	0.037	—0.016	— 24.50
Total blood	0.0602	0.0871	+0.0269	+44.60	0.0199	0.0141	—0.0058	— 29.10
Blood plasma	0.0161	0.0220	+0.0059	+36.90	0.0291	0.0217	—0.0074	— 25.40
Skin	0.109	0.111	+0.002	+ 1.83	0.026	0.027	+0.001	+ 3.85
Spleen	0.244	0.369	+0.125	+51.30	0.094	0.059	—0.035	— 37.20
Liver	0.195	0.257	+0.062	+31.70	0.064	0.035	—0.029	— 45.30
Suprarenal	0.450	0.622	+0.172	+38.20	6.486	5.640	—0.846	— 13.00

procedure of experiment remained the same as described in the case of adrenalin. The result is shown in table III.

From the table we can see that the content of free cholesterol increases in most of the organs as in the case of adrenalin injection. The degree of increase in heart muscle, red skeletal muscle, diaphragm and brain, however, is quite insignificant in comparison with the case of adrenalin. Ester cholesterol is decreased in most of the tissues, the only increased tissues being heart, brain and red muscle. It is noticeable that these tissues contain normally only a trace of ester cholesterol.

III. PILOCARPIN.

Pilocarpin hydrochlorium was injected every day into the

TABLE IV.
Pilocarpin. (Average of three animals.)

Organ or tissue	Free cholesterol				Ester cholesterol			
	Normal	Amount observed	Amount increased	Percentage increase	Normal	Amount observed	Amount increased	Percentage increase
Brain	% 2.180	% 2.232	% +0.052	% + 2.0	% 0.014	% —	% —	% -100
Lung	0.439	0.435	-0.004	—	0.0073	—	—	-100
Heart muscle	0.101	0.108	+0.007	+ 6.93	0.006	0.0087	+0.0027	+ 45.0
Diaphragm	0.055	0.0567	+0.0017	+ 3.09	0.022	0.023	+0.001	+ 4.59
Red muscle	0.0580	0.0614	+0.0034	+ 6.20	0.0036	0.0112	+0.0072	+149.0
White muscle	0.049	0.055	+0.006	+13.10	0.0054	0.0014	-0.0040	- 74.0
Testicle	0.204	0.213	+0.009	+ 4.0	0.028	0.060	+0.032	+114.0
Kidney	0.310	0.321	+0.011	+ 3.56	0.053	0.039	- 0.014	- 20.4
Total blood	0.0602	0.0838	+0.0236	+39.20	0.0199	0.0246	+0.0047	+ 23.5
Blood plasma	0.0161	0.0187	+0.0026	+16.15	0.0291	0.0414	+0.0123	+ 42.3
Skin	0.109	0.112	+0.003	+ 3.0	0.026	0.036	+0.010	+ 38.4
Spleen	0.244	0.312	+0.068	+27.83	0.094	0.160	+0.066	+ 70.2
Liver	0.195	0.191	+0.004	- 2.0	0.064	0.059	-0.015	- 24.4
Suprarenal	0.450	0.445	—	—	6.486	6.083	-0.403	- 5.95

animal in doses of 0.01 g. per Kilo body weight for a week and their tissues were examined for the content of free and ester cholesterol by the method employed in the foregoing experiments. All the animals in this experiment showed an obvious reduction in their body weight, although their appetite was rather abnormally heightend. As can be seen from table IV, the result shows that the free cholesterol content remained almost constant in every kind of tissue, only with exceptions in spleen and blood where an increase of about 30 to 40% was observed. The content of ester cholesterol remained in most of the tissues at normal value, while they were found increased in some of their tissues as spleen, blood, skin, heart muscle and red skeletal muscle.

TABLE V.

Atropin.

Organ or tissue	Free cholesterol				Ester cholesterol			
	Normal	Amount observed	Amount increased	Percentage increase	Normal	Amount observed	Amount increased	Percentage increase
Brain	2.180	2.200	+0.020	+ 0.917	0.014	—	—	—100.0
Lung	0.439	0.422	-0.017	- 3.88	0.0073	—	—	-100.0
Heart muscle	0.101	0.102	+0.001	+ 0.990	0.006	0.005	-0.001	- 16.65
Diaphragm	0.055	0.0594	+0.004	+ 8.0	0.022	0.0056	-0.0164	- 74.50
Red muscle	0.0580	0.0567	-0.0013	- 2.0	0.0036	0.0027	-0.0009	- 40.0
White muscle	0.049	0.0506	+0.0014	+ 3.90	0.0054	0.0008	-0.0046	- 85.4
Testicle	0.204	0.202	-0.002	- 0.98	0.028	0.021	-0.007	- 25.0
Kidney	0.310	0.316	-0.006	+ 2.0	0.053	0.024	-0.029	- 51.0
Total blood	0.0602	0.0831	+0.0229	+38.05	0.0199	0.0185	-0.0014	- 5.57
Blood plasma	0.0161	0.0136	-0.0025	-15.50	0.0291	0.0253	-0.0038	- 13.05
Skin	0.109	0.106	-0.003	- 3.0	0.026	0.007	-0.019	- 73.2
Spleen	0.244	0.262	+0.018	+ 7.38	0.094	0.021	-0.073	- 77.7
Liver	0.195	0.190	-0.004	- 2.00	0.064	0.016	-0.048	- 75.10
Suprarenal	0.450	0.559	+0.109	+24.2	6.486	5.884	-0.602	- 9.02

IV. ATROPIN EXPERIMENT.

Atropin sulphuricum was injected into the animal in amount of 0.01 gm. per Kilo body weight for a week, and the procedure was just as is described above. The result is shown in table V.

The content of free cholesterol remained almost constant in their values. Estercholesterol, on the other hand, tends always to be decreased. The decrease is especially obvious in spleen, liver, skin, diaphragm, kidney, white and red skeletal muscle, heart muscle and testicles.

V. THE EFFECT OF ADRENALIN INJECTION ON THE TISSUE
CHOLESTEROL CONTENT OF ANIMALS PREVIOUSLY
TREATED WITH ERGOTOXIN.

That many pharmacological effects of adrenalin injection are annulled by previous treatment with ergotoxin is a well known fact. This is also found true in the case of adrenalin effect on the cholesterol content in the tissue in the following experiment.

Ergotoxin (Merck) was injected into the animal in an amount of 0.004 mg. per Kilo bodyweight. After the lapse of two hours, 0.0005 gm. of adrenalin per Kilo body weight was injected. The treatment was continued for a week, and two hours after the last adrenalin injection, the animal was examined for its cholesterol distribution. The result is shown in table VI.

As can be seen from this table, the effect of adrenalin is entirely suppressed by the previous treatment with ergotoxin.

VI. THE TOTAL AMOUNT OF FREE AND ESTER CHOLESTEROL CONTAINED
IN THE ANIMAL BODY AND ITS VARIATION UNDER THE IN-
FLUENCE OF VARIOUS AUTONOMOUS NERVE POISONS.

In the foregoing experiments, it is shown that under the influence of adrenalin, the content of free cholesterol increases in almost every organ and tissue. A change of the same nature is observed in the case of ergotoxin but in far less degree, while

TABLE VI.
Adrenalin after ergotoxin.

Organ or tissue	Free cholesterol				Ester cholesterol			
	Normal	Amount observed	Difference	Percentage increase	Normal	Amount observed	Difference	Percentage deviation
Brain	0.180	0.213	+0.033	+ 1.51	0.014	0.0491	+0.03 51	+250.0
Lung	0.439	0.415	-0.024	- 5.45	0.0073	—	-0.0073	-100.0
Heart muscle	0.101	0.104	+0.003	+ 2.97	0.006	0.017	+0.011	+183.5
Diaphragm	0.0580	0.0566	-0.0014	- 2.0	0.0036	0.0096	+0.0060	+113.2
Red muscle	0.0490	0.0523	-0.0033	+ 7.38	0.0054	0.0045	-0.0009	- 9.10
White muscle	0.0550	0.0517	-0.0033	- 6.0	0.022	0.0171	-0.005	- 22.7
Testicle	0.204	0.211	+0.007	+ 3.0	0.028	0.044	+0.016	+ 57.2
Kidney	0.310	0.305	-0.005	+ 1.61	0.053	0.062	+0.009	+ 21.0
Total blood	0.0602	0.0840	-0.0238	+39.50	0.0199	0.0229	+0.0030	+15.10
Blood plasma	0.0161	0.0232	+0.0071	+44.2	0.0291	0.0306	+0.0015	+ 5.16
Skin	0.109	0.119	+0.010	+ 9.18	0.026	0.032	+0.006	+ 23.0
Spleen	0.244	0.271	+0.027	+11.05	0.094	0.062	-0.032	- 34.10
Liver	0.195	0.208	+0.013	+ 6.68	0.064	0.053	-0.011	- 17.20
Suprarenal	0.450	0.460	+0.010	+ 2.50	6.486	5.930	-0.556	- 8.32

pilocarpin and atropin show no trace of influence. As these changes seemed to me quite striking ones, I am interested to examine the change of the total amount of free cholesterol within the body in these cases. The examination of the total amount of free cholesterol is however quite hard, the analysis in whole skeletal muscles, skeleton, skin and other connective tissues being accompanied with many technical difficulties. I have therefore confined my examination to every organ, which could be taken out whole as is the case in brain, lung, kidney, liver, spleen, testicles, suprarenal gland and heart muscle. Although the sum of the amount of free cholesterol in these enumerated organs and tissues does not show the value of total free cholesterol within the body, it can be used as an indicator whether the increase or

TABLE VII.
Free cholesterol.

No. of animals examined	Organ		Brain	Lung	Kidney	Spleen	Heart muscle	Testicle	Supra- renal gland	Liver	Summary
			gm.	gm.	gm.	gm.	gm.	gm.	gm.	gm.	gm.
8			0.19935	0.08805	0.04500	0.00270	0.00487	0.01108	0.00180	0.09900	0.40185
9			0.20100	0.03980	0.04837	0.00211	0.00386	0.01130	0.00069	0.10800	0.41513
10			0.17430	0.03740	0.04770	0.00205	0.00505	0.00785	0.00099	0.11400	0.38934
11			0.19500	0.03680	0.03940	0.00201	0.00439	0.00830	0.00107	0.09100	0.37797
12			0.19000	0.02970	0.04010	0.00258	0.00452	0.00925	0.00275	0.12300	0.39891
Average			0.19193	0.03635	0.04411	0.00229	0.00454	0.009556	0.00146	0.10340	0.39684

Ester cholesterol.

No. of animals examined	Organ		Supra- renal gland	Liver	Spleen	Kidney	Testicle	Heart muscle	Lung	Brain	Summary
			gm.	gm.	gm.	gm.	gm.	gm.	gm.	gm.	gm.
8			0.02800	0.06700	0.00040	0.00644	0.00042	0.00071	—	—	0.10297
9			0.01981	0.03470	0.00094	0.00543	0.00380	—	0.00180	0.00520	0.07168
10			0.02626	0.2200	0.00056	0.00042	0.00053	0.00059	—	—	0.05036
11			0.01361	0.04300	0.00131	0.00860	0.00050	—	—	—	0.06702
12			0.01993	0.03700	0.00065	0.01863	0.00133	0.00049	0.00130	—	0.07933
Average			0.02152	0.04074	0.00077	0.00800	0.00132	0.00036	0.00062	0.00104	0.07127

TABLE VIII.
Free cholesterol (Average of three animals.)

Organ Condition	Brain	Lung	Kidney	Spleen	Heart muscle	Testicle	Supra- renal	Liver	Summary
Normal	gm. 0.19193	gm. 0.03635	gm. 0.04411	gm. 0.00229	gm. 0.00454	gm. 0.00956	gm. 0.00146	gm. 0.10640	gm. 0.33364
Adrenalin amount increased % increase	0.21016 + 0.01823 + 9.55%	0.04707 + 0.01072 + 29.57%	0.04973 + 0.00562 + 12.72%	0.00353 + 0.00124 + 54.29%	0.00881 0.00427 + 94.2%	0.00939 - 0.00017 - 1.011%	0.00206 0.00069 + 41.1%	0.17383 0.06943 + 65.2%	0.50658 0.10994 + 27.7%
Ergotoxin amount increased % increase	0.19033 - 0.00160 - 0.836%	0.03770 + 0.00145 + 4.00%	0.04947 + 0.00536 + 12.14%	0.00281 + 0.00052 + 22.70%	0.00505 + 0.00051 + 11.23%	0.01161 + 0.00294 + 21.35%	0.00184 + 0.00308 + 26.0%	0.16133 + 0.05393 + 50.6%	0.46116 + 0.06452 + 16.25%
Pilocarpin amount increased % increase	0.18143 - 0.01050 - 5.81%	0.03470 - 0.00165 4.63%	0.03827 - 0.00584 - 13.18%	0.00198 - 0.00031 - 13.53%	0.00415 - 0.00039 - 8.60%	0.01278 + 0.00322 + 33.70%	0.00250 + 0.00104 + 71.30%	0.11967 + 0.01327 + 12.46%	0.39548 - 0.00116 - 0.294%
Atropin amount increased % increase	0.18383 - 0.00510 - 2.66%	0.03520 - 0.00115 - 3.165%	0.04104 - 0.00307 - 6.95%	0.00186 - 0.00043 - 18.76%	0.00461 + 0.00037 + 1.54%	0.00861 - 0.00095 - 9.94%	0.00310 + 0.00164 + 112.2%	0.11153 + 0.00513 + 4.82%	0.39277 - 0.00387 - 0.976%
Adrenalin after ergotoxin amount increased % variation	0.18367 - 0.00826 - 4.31%	0.03641 + 0.00006 + 1.65%	0.03481 - 0.00939 - 2.12%	0.00215 - 0.00004 - 1.89%	0.00467 + 0.00043 + 2.87%	0.00952 - 0.00004 - 0.42%	0.00230 + 0.00084 + 57.6%	0.12387 + 0.01747 + 16.43%	0.39740 + 0.00076 + 0.193%

decrease of free cholesterol in the body is taking place. This supposition seems to be entirely valid as this sum is always constant in all normal individuals.

As can be seen from the table, the total amount of cholesterol within the body is almost the same in each animal of nearly equal body weight in normal condition. The total amount of free cholesterol is increased under the influence of adrenalin by an amount of 27%, while the injection of ergotoxin also invokes an increase of 16 per cent. In the case of pilocarpin, atropin and ergotoxin-adrenalin the total amount of free cholesterol seems to remain unchanged.

As regards to ester cholesterol, a decrease in the total ester cholesterol is observed after the injection of adrenalin and atropin, and also in moderate degree by ergotoxin. Pilocarpin does not influence any more than the range of error of determination. The same is true in the case of adrenalin injection to the animal previously treated with ergotoxin.

DISCUSSION.

The above experiments show us clearly that among the nervous poisons only those on the sympathetic nerve have a marked effect on the content of free cholesterol in the tissue. Namely, adrenalin induces an increase of free cholesterol in almost all tissues and this effect is entirely annulled by the previous treatment of the animal with ergotoxin. It is curious enough that while ergotoxin alone tends to increase the free cholesterol content of tissue, the ergotoxin injection succeeded by that of adrenalin leaves the amount of free cholesterol of tissue entirely untouched.

This is however quite conceivable when we reflect on the result of Akatsuka's experiment which indicates to us that the ergotoxin acts as an excitant of the sympathetic nerve, at the end of the first 90 minutes and that it produces the effect of a paralysier at a later period. In our experiment where the effects of various poisons were compared in first two hours after their injection,

TABLE IX.
Ester cholesterol.

Organ (Condition)	Supra- renal gland	Liver	Spleen	Kidney	Testicle	Heart muscle	Lung	Brain	Summary
Normal	gm. 0.02151	gm. 0.04074	gm. 0.00077	gm. 0.00800	gm. 0.00132	gm. 0.00336	gm. 0.00062	gm. 0.00104	gm. 0.07427
Adrenalin amount varied percentage variation	0.01062 - 0.01090 - 50.70%	0.01673 - 0.02401 - 59.90%	0.00013 - 0.00064 - 83.2%	0.00483 0.00337 + 42.10%	0.00171 + 0.0039 + 29.6%	0 - 0.00036 100.0%	0 - 0.00062 - 100.0%	0 0.00104 100.0%	0.03382 0.04045 54.4%
Ergotoxin amount varied percentage variation	0.01721 - 0.00431 - 20.0%	0.02257 0.01817 - 44.60%	0.00048 - 0.00029 - 37.7%	0.00481 - 0.00319 - 39.9%	0.00122 - 0.00010 - 7.58%	0.00074 + 0.00038 + 105.5%	0 - 0.00062 - 100.0%	0.00450 + 0.00046 + 38.2%	0.05163 - 0.02264 - 30.52%
Pilocarpin amount varied percentage variation	0.03454 + 0.01302 + 60.7%	0.03053 - 0.01021 25.1%	0.00096 - 0.00019 - 24.6%	0.00460 - 0.00340 - 42.5%	0.00387 + 0.00255 + 193.0%	0.00034 0.00002 - 5.55%	0 - 0.00062 - 100.0%	0 0.00104 100.0%	0.07484 + 0.00057 + 0.768%
Atropin amount varied percentage variation	0.03341 + 0.01189 + 57.3%	0.00960 - 0.03114 76.2%	0.00016 - 0.00061 79.3%	0.00311 0.00489 - 61.2%	0.00063 0.00039 - 29.5%	0.00029 - 0.00016 44.5%	0 - 0.00062 100.0%	0 - 0.0104 100.0%	0.04741 - 0.02686 36.2%
Adrenalin after ergotoxin amount varied percentage variation	0.02713 + 0.00561 + 26.2%	0.03484 - 0.00590 14.5%	0.00045 - 0.00032 41.5%	0.00709 - 0.00091 11.36%	0.00198 + 0.00063 + 50.0%	0.00084 + 0.00048 + 133.0%	0 - 0.00062 100%	0.00400 + 0.00296 + 28.5%	0.07633 + 0.00206 + 2.78%

the effect of ergotoxin as an excitant of the sympathetic nerve is not yet over and the amount of free cholesterol is found increased, as if it acted as an sympathetic excitant. In our experiment with ergotoxin and adrenalin combined, however, the adrenalin injection was made at the beginning of the third hour, after the injection of ergotoxin and the content of cholesterol was determined at the end of the fourth hour of ergotoxin period. The adrenalin, therefore, was injected when ergotoxin evoked its effect as a paralysing agent entirely and the adrenalin effect was naturally suppressed totally.

It may be concluded from the above results that the excitation of the sympathetic nerve end induces the free cholesterol content of tissues.

REFERENCES.

- Akatsuka, H. (1927): *The Journal of Biochem.* **7**, 27.
Morita, Ch. (1924): *The Journal of Biochem.* **4**, 73.
Tsuneyoshi (1927): *The Journal of Biochem.* **7**, 227.

STUDIES ON THE BEHAVIOUR OF CHOLESTEROL WITHIN THE ANIMAL BODY.

IV. The rôle of thyroid gland in the content of cholesterol in each organ and tissue.

By

JINYE ONIZAWA.

*(From the Biochemical Institute, Tokyo Imperial University.
Director: Prof. Samuro Kakiuchi.)*

(Received for publication, December 28, 1928.)

In the preceding reports it was shown that the adrenalin injection causes the increase in the content of free cholesterol in various tissues, while in most of these tissues the amount of ester cholesterol is found to be decreased. As it has become clear that the adrenalin injection promotes the oxygen consumption of the animal on the one hand, and that this action is highly promoted by the hormon of the thyroid gland, while in the absence of suprarenal gland the latter has no action on the promotion of oxydative activity, it seems to me very interesting to investigate, how the amount of tissue cholesterol varies under various conditions in regards to the functional activity of these two hormonal glands. The search for distribution of free and ester cholecterol in tissues should extend to the following cases.

1. Normal condition.
2. Thyroid depleted.
3. Depletion of suprarenal body.
4. Thyroid depletion with adrenalin injection.
5. Thyroid feeding.
6. Depletion of adrenalin bodies with thyroid feeding.
7. Depletion of adrenalin with thyroid extirpation.

In my experiment, where the time available for research was limited, the cases with depletion of suprarenal bodies were not

treated and the experiment with thyroid feeding was also conducted in limited numbers of tissues. In the following pages, the results obtained are mentioned.

I. EXPERIMENT WITH THYROID EXTIRPATED ANIMAL.

Thyroid glands were extirpated in both sides from male rabbits, weighing from 2000-2500 gm. The oxygen consumption was reduced by the amount of 24.0-33.3% of pre-operative period, when determined with Krogh's spirometer. The body weight of operated animals was found in general to be increased. After the elapse of fourteen days all the animals were killed and the amount of free cholesterol and ester cholesterol was determined, just as was described in the former report. The results are shown in

TABLE X.
Thyroid extirpated. (average of three animals).

Organ or tissue	Free cholesterol				Ester cholesterol			
	Normal	Amount observed	Amount increased	Percentage increase	Normal	Amount observed	Amount increased	Percentage increase
Brain	% 2.180	% 2.002	% -0.178	% - 8.16	% 0.014	% 0.013	% -0.001	% - 0.715
Lung	0.439	0.374	-0.065	- 14.8	0.0073	0.0107	+0.0034	+ 46.6
Heart muscle	0.101	0.108	+0.007	+ 6.93	0.006	0.002	-0.004	- 33.4
Diaphragm	0.055	0.057	+0.002	+ 3.40	0.022	0.010	-0.012	- 54.5
Red muscle	0.058	0.0493	-0.0087	- 15.0	0.0036	0.0099	+0.0063	+175.0
White muscle	0.0490	0.0436	-0.0054	- 11.0	0.0054	0.0121	+0.0067	+124.0
Testicle	0.204	0.194	-0.010	- 4.90	0.028	0.024	-0.004	- 14.30
Kidney	0.310	0.322	+0.012	+ 3.87	0.053	0.013	-0.040	- 75.5
Total blood	0.0602	0.094	+0.0338	+ 39.5	0.0199	0.046	+0.0261	+132.1
Blood plasma	0.0161	0.0424	+0.0263	+163.3	0.0291	0.0830	+0.0539	+185.3
Skin	0.109	0.124	+0.015	+ 13.8	0.026	0.016	-0.010	- 38.5
Spleen	0.244	0.303	+0.059	+ 24.2	0.094	0.030	-0.064	- 68.1
Liver	0.195	0.238	+0.043	+ 22.55	0.064	0.046	-0.018	- 28.1
Suprarenal	0.450	0.660	+0.210	+ 46.6	6.486	11.123	+4.637	+ 71.50

table X. As can be seen from the table, the amount of free cholesterol was found increased in liver, spleen, skin suprarenal and blood in thyroid extirpated animal, while tissues where oxidative activity mostly occurs, like brain, heart and skeletal muscle were rather decreased in their free cholesterol content. On the other hand ester cholesterol was increased in suprarenal gland and blood. There is no visible change in other tissues observed.

II. ADRENALIN INJECTION AFTER THYROID EXTIRPATION.

After a lapse of a week from the thyroid extirpation in both sides, adrenalin in an amount of 0.5 mg. per Kilo body weight of the animal was injected once every day for a week and the deter-

TABLE XI.

Adrenalin after thyroid extirpated. (average of three animals).

Organ or tissue	Free cholesterol				Ester cholesterol			
	Normal	Amount observed	Amount increased	Percentage increase	Normal	Amount observed	Amount increased	Percentage increase
Brain	% 2.180	% 2.554	% 0.374	% + 17.35	% 0.014	% 0	% - 0.014	% - 100.0
Lung	0.439	0.409	0.030	- 6.84	0.0073	0.0067	- 0.0006	- 8.22
Heart muscle	0.101	0.149	0.048	+ 47.6	0.006	0	- 0.006	- 100.0
Red muscle	0.0580	0.0781	0.0201	+ 34.7	0.0036	0.0010	- 0.0026	- 72.1
White muscle	0.0490	0.0567	0.0077	+ 15.7	0.0054	0.0055	+ 0.0001	+ 1.85
Diaphragm	0.0550	0.0760	0.0210	+ 38.2	0.022	0.0052	- 0.0168	- 76.4
Testicle	0.204	0.225	0.021	+ 10.3	0.028	0.029	+ 0.001	+ 3.58
Kidney	0.310	0.362	0.052	+ 16.80	0.053	0.034	- 0.019	- 35.9
Total blood	0.0602	0.082	0.0218	+ 36.20	0.0199	0.054	+ 0.0341	+ 171.4
Blood plasma	0.0161	0.0426	0.0265	+ 164.8	0.0291	0.0814	+ 0.0523	+ 179.8
Skin	0.109	0.141	0.032	+ 39.4	0.026	0.005	- 0.021	- 80.8
Spleen	0.244	0.434	0.190	+ 78.0	0.094	0.026	- 0.068	- 72.4
Liver	0.195	0.221	0.026	+ 13.3	0.064	0.047	- 0.017	- 26.6
Suprarenal	0.450	0.761	0.311	+ 69.0	6.486	10.430	+ 3.944	+ 60.9

TABLE XII.
Free cholesterol.

Condition	Organ	Brain	Lung	Kidney	Spleen	Heart muscle gland	Testicle	Supra-renal	Liver	Summary
		gm.	gm.	gm.	gm.	gm.	gm.	gm.	gm.	gm.
Normal		0.19193	0.03635	0.04411	0.00229	0.00454	0.00956	0.00146	0.10649	0.39634
Thyroid extirpation		0.16417	0.03287	0.04247	0.00296	0.00477	0.00682	0.00237	0.14518	0.40161
Amount deviated		- 0.02776	- 0.00346	- 0.00164	- 0.00067	+ 0.00023	0.00274	0.00091	+ 0.03878	0.00497
Percentage deviation		- 14.45%	9.57%	- 3.72%	29.2%	+ 5.11%	- 28.7%	+ 62.4%	+ 36.6%	+ 1.25%
Adrenalin after thyroid extirpation		0.21677	0.03400	0.04743	0.00219	0.00597	0.00754	0.00268	0.14365	0.46123
Amount deviated		+ 0.02484	0.00235	0.00332	0.00010	+ 0.00143	0.00202	+ 0.00122	0.03725	0.06359
Percentage deviation		+ 12.95%	- 6.47%	+ 7.53%	4.18%	+ 31.5%	21.2%	+ 83.7%	+ 35.0%	+ 16.0%

Ester cholesterol.

Condition	Organ	Supra-renal gland	Liver	Spleen	Kidney	Testicle	Heart muscle	Lung	Brain	Summary
		gm.	gm.	gm.	gm.	gm.	gm.	gm.	gm.	gm.
Normal		0.02152	0.04074	0.00074	0.00800	0.00132	0.00036	0.00362	0.00104	0.074227
Thyroid extirpation		0.04112	0.02832	0.000303	0.00170	0.000835	0.00012	0.00087	0.00100	0.07427
Amount deviated		+ 0.01960	- 0.01242	0.000437	- 0.00630	- 0.000485	- 0.00024	+ 0.00125	0.00004	0
Percentage deviation		+ 91.2%	- 30.5%	59.0%	78.8%	36.7%	66.6%	+ 40.3%	3.85%	0
Adrenalin after thyroid extirpation		0.03635	0.03184	0.00013	0.00447	0.00096	0	0.00033	0.00533	0.07908
Amount deviated		+ 0.01483	- 0.00890	- 0.00061	- 0.00353	0.00036	- 0.00036	0.00029	+ 0.00429	+ 0.00481
Percentage deviation		+ 69.0%	- 21.8%	82.5%	44.2%	27.2%	100%	46.8%	+ 41.2%	+ 6.18%

mination of cholesterol, both free and combined, was made by the method described in the foregoing paper. The result is shown in table XI.

We can see from the table that the injection of adrenalin to the thyroidectomized animal evokes the same kind of change in cholesterol content as is the case of adrenalin injection in the normal animal.

The only exception is observed in liver and lung. Whereas the mere adrenalin injection induces the increase of free cholesterol in liver and lung, the adrenalin injection in the thyroidectomized animal increase in liver does not amount to much and in the lung even a decrease is observed. The adrenalin injection has almost no effect in cholesterol ester content after the thyroid extirpation.

These findings indicate clearly that adrenalin injection evokes the increase of free cholesterol in the tissue of an animal without any regard to the presence or absence of thyroid gland. Cholesterol ester, however, is not influenced by adrenalin in thyroprived animal.

III. FEEDING EXPERIMENT WITH THYROID PREPARATE.

1 gm. of thyroid powder was fed to the animal every day for a week. During this period the body weight and the amount of oxygen consumption of the animal were examined every day. The body weight decreased steadily day by day and after a week the animal was found to be very much reduced, while the oxygen consumption was found to be increased. Then the amount of cholesterol in the tissue was determined. The increase of oxygen consumption was about 25–50%, in most cases.

The result of the examination is given in table XIII.

It can be seen from the table that free cholesterol increases by the feeding of thyroid gland, while cholesterol ester is not influenced enough to be mentioned.

TABLE XIII.
Free cholesterol.

Condition \ Organ	Brain	Heart muscle	Liver	Suprarenal gland
Normal	% 2.180	% 0.101	% 0.195	% 0.450
Thyroid powder fed	2.309	0.130	0.316	0.662
Difference	+ 0.129	0.029	0.121	0.212
Percentage of deviation	+ 5.92	+28.7	+ 62.1	+47.1
Adrenalin with thyroid	2.660	0.162	0.398	0.571
Difference	0.480	0.061	0.203	0.121
Percentage of deviation	+22.0	+60.5	+104.0	+26.9

Ester cholesterol.

Condition \ Organ	Suprarenal gland	Liver	Heart muscle	Brain
Normal	% 6.486	% 0.064	% 0.006	% 0.014
Thyroid powder fed	7.963	0.045	—	—
Difference	+ 1.487	— 0.021	— 0.006	— 0.014
Percentage of deviation	+22.9	—32.8		
Adrenalin with thyroid	3.319	0.037	—	—
Difference	— 3.167	— 0.027	0.006	— 0.014
Percentage of deviation	—48.9	—42.2		

IV. THE EFFECT OF ADRENALIN INJECTION AND
THYROID FEEDING.

The thyroid fed animal, treated as just described above, was injected with adrenalin in amount of 0.5 mg. per Kilo body weight. Thyroid was given every day in the morning, together with ordinary rations, and adrenalin was injected at noon. Thyroid feeding and adrenalin injection were repeated for a week and the cholesterol contents of tissues were examined with these animals. The result is given in table XIII.

The effect of adrenalin injection on the free cholesterol content is therefore most accentuated by the simultaneous feeding of the thyroid gland. The thyroid feeding seems however to evoke no obvious effect in the adrenalin action on cholesterol ester content in tissue.

CONCLUSION.

The above results indicate that the thyroid extirpation shows only a slight effect on the free cholesterol content of tissue. The amount of ester cholesterol also remains the same in most kinds of tissue, with the exception of adrenal bodies and blood plasma, where it is increased very obviously. Both of these tissues retain high ester cholesterol contents, even in the case of adrenalin injections. It seems to me therefore highly probable that the hormone of thyroid gland is important somehow in the free cholesterol formation from its ester, which probably proceeds within the liver. On the other hand, adrenalin provokes the increase of free cholesterol probably taken up from the circulating blood, in many of the most active tissues, without regard to the presence or absence of thyroid gland. The amount of increase of free cholesterol content in tissue induced by adrenalin injection is however somewhat lower in the case of the thyroid extirpated animal, because of the limited amount of free cholesterol formation in the liver. Adrenal bodies and blood plasma play, so to speak, a depot place

for cholesterol ester, which is transported into the liver and is transformed into free cholesterol. The latter is conveyed to each of the active tissues. When the free cholesterol becomes a surplus, a change in the opposite direction is observed. The hormon of thyroid gland seems to play some important rôle in this change within the liver.

GENERAL SUMMARY.

The main results obtained in the foregoing II, III and IV communications, may be summarized as follows.

1. Under normal conditions the contents of free cholesterol within the animal body is strikingly constant.

2. The amount of free cholesterol in many of the active tissues is increased by the injection of adrenalin. This effect of adrenalin is entirely suppressed by the previous treatment with ergotoxin. The excitant period of ergotoxin however evokes the same effect as adrenalin. The excitation of the sympathetic nerve ending therefore seems to cause increas in the free cholesterol content of tissue.

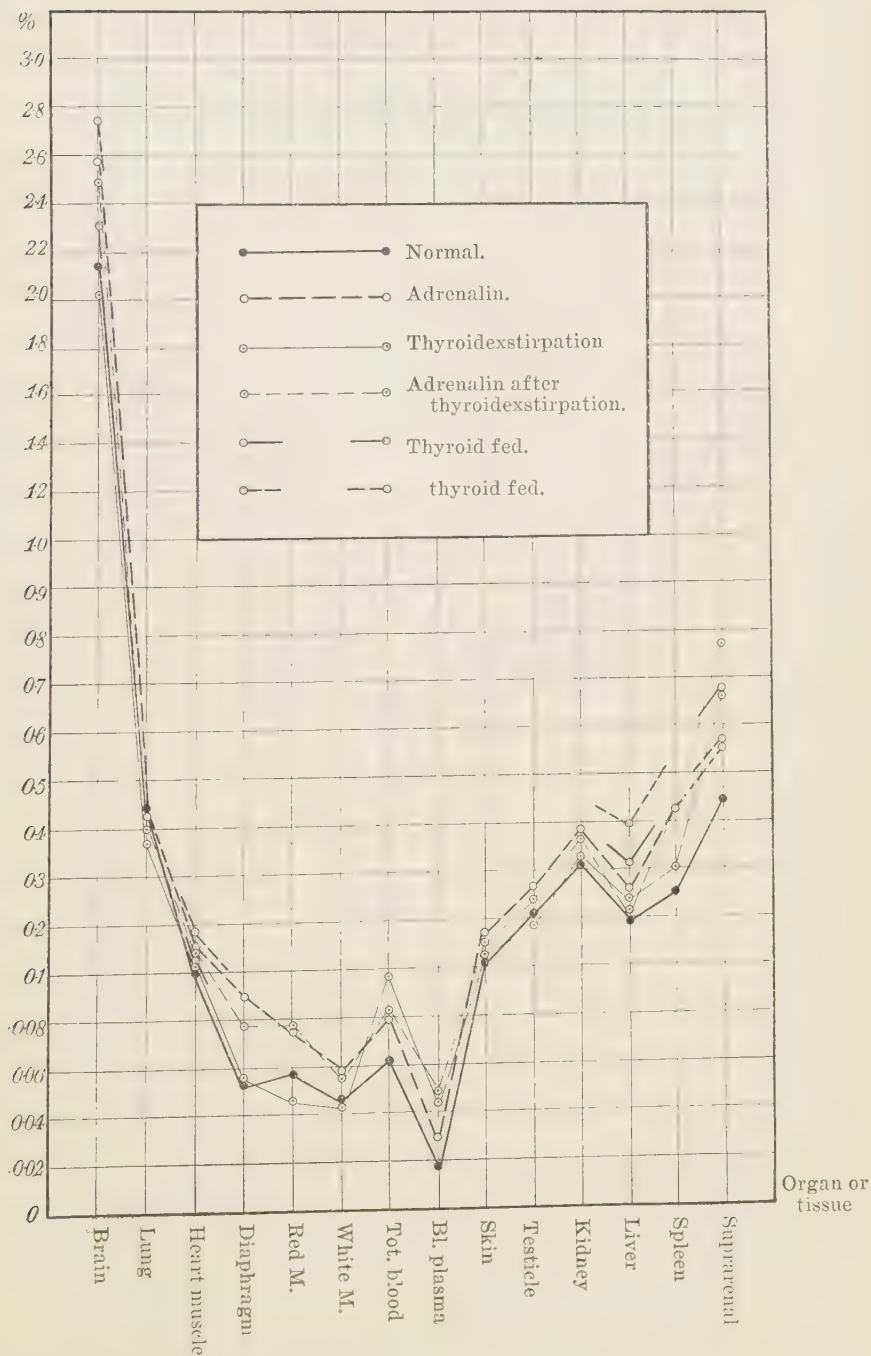
3. The effect of adrenalin in increasing the free cholesterol content of tissue is found without any regard to the presence or absence of thyroid gland.

4. The extirpation of thyroid gland induces the reduction in the amount of oxygen consumption. Together with this change the reduction of free cholesterol content in brain, lung and skeletal muscle is observed.

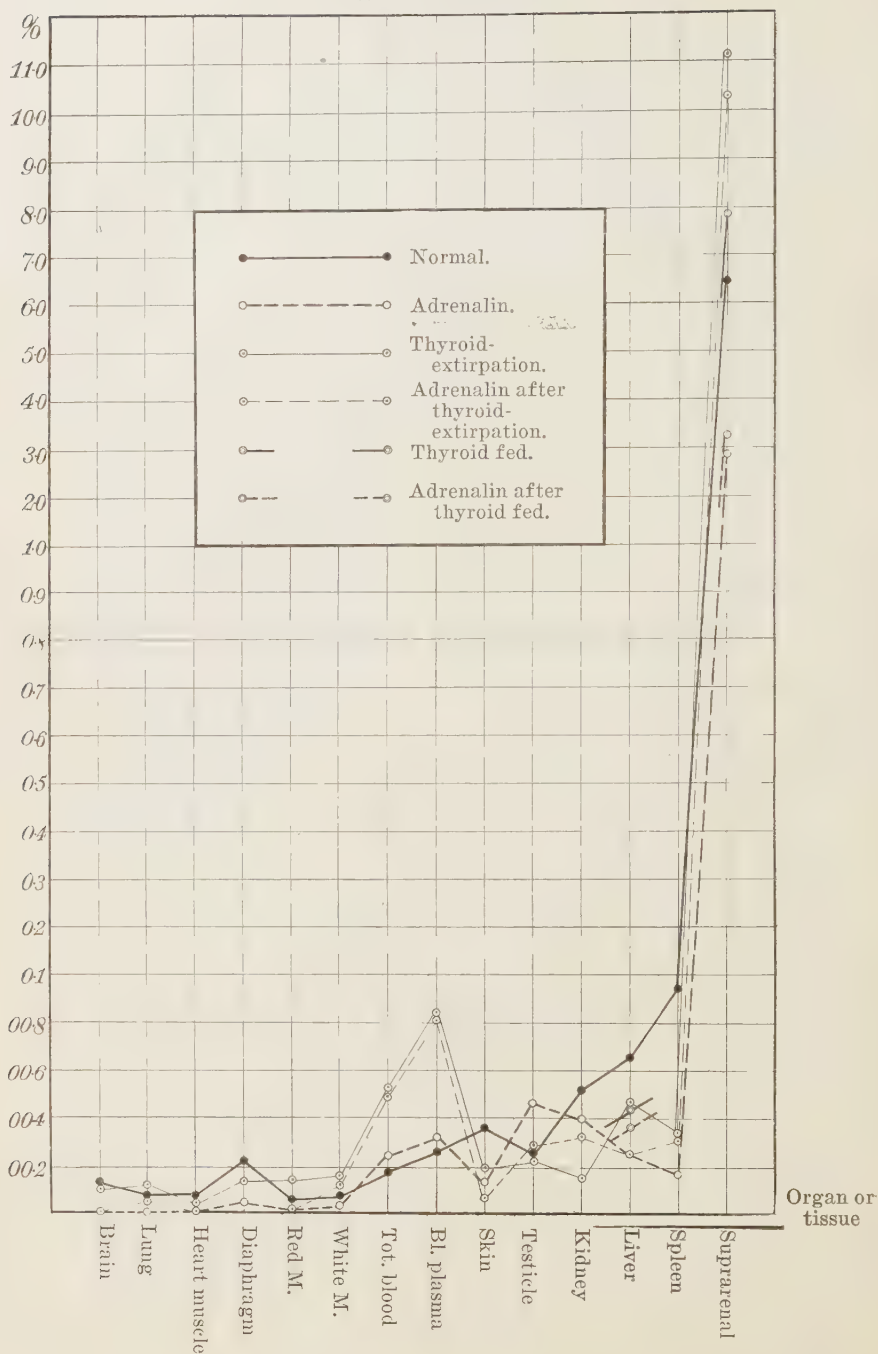
5. The amount of ester-cholesterol in adrenal bodies and blood plasma is increased in thyroiddepleted animal. This effect is not influenced by the injection of adrenalin at all. The hormon of thyroid gland seems to play some rôle in the free cholesterol formation from its ester.

I wish to express my sincere thanks to Prof. S. Kakiuchi for his kind advice throughout the course of the investigation.

Free Cholesterol.



Ester Cholesterol.



ÜBER DAS ALLANTION IN DER GALLE DES HUNDES.

Von

SHIGEO YOSHIMURA.

(Aus der med. Klinik der Universität, Nagasaki, Japan.
Direktor: Prof. Dr. M. Tsudji.)

(Eingegangen am 22. Februar 1929)

Harnsäure (Brugsch und Rother, 1922 und 1923) und Harnstoff (Hammarsten, 1898; Botazzi, 1908 und Cohen, 1923) werden sowohl in der tierischen, als auch in der menschlichen Galle gefunden. Aber die andersartigen stickstoffhaltigen, harnfähigen Substanzen in der Galle sind im allgemeinen sehr wenig untersucht. Vor kurzem habe ich mitgeteilt, dass daneben Allantoin, Kreatin, Kreatinin, Ammoniak und Aminosäure immer sowohl in der normalen wie in der pathologischen Blasenfistelgalle des Hundes zu finden sind (Yoshimura, 1928). Neuerdings wird die Leber nicht nur als ein Sekretionsorgan, sondern auch als ein Ausscheidungsorgan betrachtet. Aber wie weit diese Substanzen den Stoffwechselversuch beeinflussen können, hängt selbstverständlich von den Mengenverhältnissen dieser Substanzen in Galle und Harn ab.

In dem Purinstoffwechselversuche geht immer ein Teil der dem Versuchstiere einverleibten Harnsäure verloren. Deshalb hat man einen urikolytischen Vorgang im tierischen Körper angenommen (Schittenhelm, 1905 und Ascoli u. Izar, 1909). 1922 fand Brugsch Harnsäure in der menschlichen Blasengalle gravimetrisch sehr reichlich vor (0–30 mg%). Auf Grund dieses Befundes schrieb er der Galle eine wesentliche Rolle für den Purinstoffwechsel zu, sodass das Problem der Uricämie ohne Berücksichtigung der Harnsäure in der Galle nicht mehr diskutiert werden kann, während Harpuder (1923) nur wenig Harnsäure in der

menschlichen Galle fand. Beim Hunde dürfte es aber etwas anders sein, weil das Allantoin für den Purinstoffwechsel im Tiere viel mehr im Vordergrunde steht als die Harnsäure. Die Resultate

Harnsäure im normalen Zustande.

Datum	Nr.	K. G. (kg)	Galle			Harn			Prozentuales Verhältnis d. Gallenharn- säure zur Harnharn- säure
			Menge (ccm)	mg%	Ges. Gew. (mg)	Menge (ccm)	mg%	Ges. Gew. (mg)	
19/III	5	8,9	70	0,50	0,35	—	—	—	—
28/ „	5	9,0	135	0,39	0,53	—	—	—	—
26/ „	6	16,1	250	0,25	0,63	950	14,0	133,0	0,47
						1100	7,5	82,5	0,76
11/ „	7	11,0	75	0,42	0,32	—	—	—	—
28/ „	8	13,5	220	0,15	0,33	500	41,0	205,0	0,16
2/VI	9	10,4	135	0,30	0,41	650	7,6	49,0	0,84
8/VIII	11	17,9	140	0,34	0,47	480	21,0	100,8	0,47
29/XII	12	10,2	170	0,54	0,88	250	27,0	67,5	1,30
4/III	14	10,6	130	0,50	0,65	300	27,5	82,5	0,79
5/ „	14	10,6	110	0,68	0,74	200	58,0	116,5	0,64
durchschnittlich				0,37	0,53		20,8	104,6	0,55

Harnsäure bei intravenöser Injektion von Harnsäure.

(Harnsäure 1 gr in n/10 -Natronlauge gelöst).

Datum	Nr.	K. G. (kg)	Galle			Harn			Prozentuales Verhältnis d. Gallenharn- säure zur Harnharn- säure
			Menge (ccm)	mg%	Ges. Gew. (mg)	Menge (ccm)	mg%	Ges. Gew. (mg)	
4/IV	6	15,5	270	0,7	1,9	600	12,5	75,0	2,5
						300	15,1	45,3	4,2
12/ „	7	11,4	140	2,9	4,0	—	—	—	—
4/ „	8	13,5	240	0,4	1,0	500	19,5	97,5	1,0
8/VI	9	10,5	95	0,6	0,6	230	13,7	31,5	1,9
9/ „	9	10,5	160	0,2	0,3	200	14,5	25,0	1,0
durchschnittlich				0,9	1,4		15,0	48,8	2,3

aus meinen ausgedehnten vergleichenden Untersuchungen mit Galle und Harn bei Hunden, welche Gallenblasenfistel hatten, sind nachfolgend zusammengestellt. Ich bestimmte die Harnsäure nach Harpuder und das Allantoin nach Wiechowski (1913).

Harnsäure bei Oraler Darreichung.

(Harnsäure 5 gr per os).

Datum	Nr.	K. G. (kg)	Galle			Harn			Prozentuales Verhältnis d. Gallenharn- säure zur Harnharn- säure
			Menge (ccm)	mg%	Ges. Gew. (mg)	Menge (ccm)	mg%	Ges. Gew. (mg)	
11/VIII	11	17,0	140	0,1	0,2	420	12,0	50,4	0,4
12/ „	11	17,0	280	1,1	3,2	400	45,0	180,0	1,8
29/XII	12	9,8	180	0,7	1,3	430	35,0	150,0	0,9
30/ „	12	9,8	120	0,2	0,2	190	33,0	62,7	0,3
25/II	13	15,6	235	1,1	2,5	590	37,5	221,3	1,1
26/ „	13	15,6	180	0,3	0,5	530	17,8	94,3	0,5
8/III	14	10,4	150	2,7	4,0	430	35,0	150,5	2,7
9/ „	14	10,4	135	0,6	0,9	120	25,0	47,0	1,9
durchschnittlich				0,8	1,5		30,0	119,5	1,3

Harnsäure bei phosphorvergiftetem Zustande.

Datum	Nr.	K. G. (kg)	Galle			Harn			Prozentuales Verhältnis d. Gallenharn- säure zur Harnharn- säure
			Menge (ccm)	mg%	Ges. Gew. (mg)	Menge (ccm)	mg%	Ges. Gew. (mg)	
11/IV	6	16,3	250	0,38	0,95	800	25,0	200,0	0,48
12/ „	6	16,3	240	0,50	1,20	950	15,0	142,0	0,85
16/VII	7	18,5	180	0,25	0,45	400	12,0	48,0	0,94
11/IV	8	13,5	230	0,25	0,58	—	—	—	—
15/VI	9	10,4	140	0,28	0,39	450	14,0	63,0	0,61
19/VIII	11	17,0	170	0,30	0,51	200	45,0	90,0	0,57
2/III	13	15,3	60	0,50	0,30	550	10,0	55,0	0,54
durchschnittlich				0,34	0,64		20,1	99,6	0,58

*Harnsäure bei Harnsäurefütterung (5 gr)
im phosphorvergifteten Zustande.*

Datum	Nr.	K. G. (kg)	Galle			Harn			Prozentuales Verhältnis d. Gallenharn- säure zur Harnharn- säure
			Menge (ccm)	mg%	Ges. Gew. (mg)	Menge (ccm)	mg%	Ges. Gew. (mg)	
15/IV	6	16,5	175	0,75	1,31	950	15,5	147,2	0,9
23/VII	7	18,3	150	0,30	0,45	350	19,4	67,9	0,7
24/ „	7	18,3	180	0,75	1,35	600	58,0	348,0	0,4
24/VIII	11	17,0	190	0,65	1,24	250	95,0	237,5	0,5
25/ „	11	17,0	190	0,30	0,57	300	60,0	180,0	0,3
durchschnittlich				0,55	0,98		49,5	196,1	0,5

Allantoin im normalen Zustande.

Datum	Nr.	K. G. (kg)	Galle			Harn			Prozentuales Verhältnis d. Gallenallan- toin zur Harnallan- toin
			Menge (ccm)	mg%	Ges. Gew. (mg)	Menge (ccm)	mg%	Ges. Gew. (mg)	
8/VIII	11	17,9	140	3,6	5,1	480	69,9	335,6	1,5
29/XII	12	10,3	170	3,1	5,3	250	58,4	146,1	3,6
20/II	13	15,3	54	43,4	23,4	180	327,0	588,7	4,0
21/ „	13	15,3	42	30,5	12,8	540	218,0	1177,5	1,1
4/III	14	10,6	130	12,6	16,4	300	291,1	873,3	1,9
5/ „	14	10,6	110	20,8	22,9	200	450,3	900,6	2,3
durchschnittlich				18,9	14,3		235,8	670,3	2,4

Allantoin bei Harnsäurefütterung (5 gr).

Datum	Nr.	K. G. (kg)	Galle			Harn			Prozentuales Verhältnis d. Gallenallan- toin zur Harnallan- toin
			Menge (ccm)	mg%	Ges. Gew. (mg)	Menge (ccm)	mg%	Ges. Gew. (mg)	
11/VIII	11	17,0	140	12,0	16,8	420	89,5	376,2	4,5
12/ „	11	17,0	280	6,1	17,2	400	210,9	843,7	2,0
7/ I	12	9,8	180	6,7	12,2	430	50,2	215,9	5,5
8/ „	12	9,8	120	4,9	5,8	190	118,3	224,3	2,6
25/II	13	15,6	235	40,9	98,2	590	253,9	1498,0	6,6
26/ „	13	15,6	180	11,7	21,0	530	152,3	807,2	2,6
8/III	14	10,4	150	17,3	26,0	—	—	—	—
9/ „	14	10,4	135	22,4	31,4	190	703,9	1337,4	2,3
durchschnittlich				15,2	28,6		225,5	757,6	3,7

Allantoin bei phosphorvergiftetem Zustande.

Datum	Nr.	K. G. (kg)	Galle			Harn			Prozentuales Verhältnis d. Gallenallan- toin zur Harnallan- toin
			Menge (ccm)	mg%	Ges. Gew. (mg)	Menge (ccm)	mg%	Ges. Gew. (mg)	
29/IV	6	16,5	175	1,9	3,3	380	29,0	110,4	3,0
16/VII	7	18,5	180	1,2	2,2	400	26,0	104,2	2,2
19/VIII	11	17,0	170	1,7	2,9	200	197,7	418,4	0,7
2/III	13	15,0	60	20,2	12,1	550	101,1	556,1	2,2
durchschnittlich				6,2	5,1		92,6	291,0	2,0

*Allantoin bei Harnsäurefütterung (5 gr)
in phosphorvergiftetem Zustande.*

Datum	Nr.	K. G. (kg)	Galle			Harn			Prozentuales Verhältnis d. Gallenallan- toin zur Harnallan- toin
			Menge (ccm)	mg%	Ges. Gew. (mg)	Menge (ccm)	mg%	Ges. Gew. (mg)	
23/VIII	6	18,3	150	4,1	6,1	350	206,3	722,2	0,8
24/ „	6	18,3	180	1,7	3,1	600	118,6	711,4	0,4
24/VIII	11	17,0	190	2,6	4,9	250	116,3	290,9	1,7
25/ „	11	17,0	190	3,1	5,8	300	103,7	311,1	1,8
durchschnittlich				2,8	5,0		136,2	508,9	1,2

Wie man in der Tabelle sieht, betrug die Harnsäure in der Galle nur 0,37 mg% und 0,5 mg der absoluten Menge im normalen Zustande; das Mengenverhältnis der Harnsäure in der Galle zu der im Harne betrug nur 0,55% im Durchschnitte. Aber bei der Darreichung von Harnsäure, intravenös oder per os, vermehrte sich die Harnsäure in der Galle und im Harne, und zwar stieg das Mengenverhältnis der Harnsäure der Galle zu der des Harnes auf 2,3% bei der intravenösen Darreichung und 1,3% bei der Darreichung per os. Aus diesem Ergebnisse ersieht man, dass die Harnsäure in der Galle hinsichtlich des Purinstoffwechsels, wenigstens im gewöhnlichen Zustande, keine Rolle spielt. Dagegen wurde Allantoin sehr reichlich in der Galle gefunden. Und zwar betrug seine Konzentration 18,9 mg% und die absolute Tagesmenge 14,3 mg in Durchschnitte. Bei der Darreichung von Harnsäure vermehrte sich das Allantoin in der Galle beträchtlich. Es betrug durchschnittlich 28,6 mg in einem Tage (bisweilen sogar 98,2 mg.). Sein Mengenverhältnis zu dem des Harnes betrug normal 2,4%, bei Harnsäurefütterung 3,7%, bisweilen 6,6%. Bei Phosphorvergiftung verminderte sich das Allantoin sowohl in der

Galle, als auch im Harn bis auf die Hälfte des normalen Bestandes, weil die Leberfunktion für Allantoinbildung aus Harnsäure durch Phosphorvergiftung gestört war. Wenn man also die Galle in Bezug auf den Purinstoffwechsel im Sinne der Brugsch'schen Behauptung betrachtet, muss bei der Stoffwechseluntersuchung beim Tiere das Allantoin der Galle viel bedeutungsvoller sein, als die Harnsäure der Galle. Die Bestimmung des Allantoins in der Galle wurde zum ersten Mal von mir ausgeführt. Aus wissenschaftlichem Interesse versuchte ich noch weiter elementaranalytisch zu bestätigen, dass der Stickstoff in der Allantionfraktion der Galle tatsächlich derselbe des Allantoins ist. Der Hund mit Gallenblasenfistel wurde täglich mit 5,0 g Harnsäure gefüttert und die sezernierte Galle im Glas gesammelt. Die Ausgangsmenge der Galle betrug für die Untersuchung 2200 ccm. Bei der Isolierung des Allantoins aus der Galle verfuhr ich genau wie Wiechowski bei der Darstellung desselben für Harn und bekam schöne weisse Krystalle. Die Ausbeute betrug 0,62 g. Der Krystall schmolz bei 232°C, Analyse wie folgt:

0,1568 g Substanz gab 0,1766 g CO₂ und 0,0626 g H₂O.

0,1388 g Substanz nach Kjeldahl verbrannt, verbraucht 35,3 ccm n/10-H₂SO₄.

	%	%	%
C ₄ H ₆ N ₄ O ₃ (Allantoin) Ber.:	C 30,33;	H 3,83;	N 35,49.
Gef.:	C 30,71;	H 4,46;	N 35,60.

Zum Schluss fühle ich mich verpflichtet, meinem verehrten Herrn Prof. Dr. M. Tsudji und Herrn Dozent Dr. Y. Sendju meinen herzlichen Dank für ihre überaus freundliche Leitung auszusprechen.

LITERATUR.

Brugsch, Th. und Rother, J., (1922): Klin. Wochenschr., **2**, 1495 und 1729.

„ „ „ (1923): **1**, 1209.

- Hammersten, O., (1898): Zeitschr. f. physiolog. Chem., **24**, 322.
Bottazzi, (1908): Arch. f. Physiolog. **5**, 243 (zit. aus Biochem. Zeitschr., **139**, 516 (1923)).
Cohen, J. B., (1923): Biochem. Zeitschr., **139**, 516.
Yoshimura, S., (1928): Nagasaki Igakkaizassi, **6**, No. 5.
Schittenhelm, A., (1905): Zeitschr. f. physiolog. Chem., **45**, 121.
Ascoli, M. und Izar, G., (1909): Zeitschr. f. physiolog. Chem., **58**, 529.
Harpuder, K., (1923): Klin. Wochenschr., **1**, 436.
Wiechowski, W., (1913): Die Analyse des Harns, Wiesbaden.

BEITRÄGE ZUR EMBRYOCHEMIE DER REPTILIEN.

VON

MASAJI TOMITA und MITARBEITERN.

*(Ausgeführt mit Mitteln der Kaiserlichen Akademie zur Förderung
der Wissenschaften.)*

*(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der medizinischen
Akademie in Nagasaki.)*

VIII. Über das Verhalten des Ovomukoides und Cholins bei der Bebrütung des Meerschildkröteneies.

VON

MASAO TAKAHASHI.

(Eingegangen am 6. April 1929.)

Sämtliche bisher in der Literatur erschienenen Angaben über das Vorkommen von Ovomukoid im Ei beziehen sich lediglich auf das leichtest zugängliche Untersuchungsmaterial, das Vogelei. Eine Ausnahme hiervon bildet eine von Komori (1926) im hiesigen Institut ausgeführte Untersuchung über die Mukoidsubstanz in der Eissackflüssigkeit der Gastropoden.

Der ziemlich grosse Gehalt an Ovomukoid im Ei, welches den Schutz der Zellen und Gewebe vor Schädigungen der physikalischen Eigenschaft des Ovomukoides verdankt, dann nicht ohne besondere physiologische Bedeutung sein. Um die Frage aufzuklären, welche Aufgabe diese Substanz zu erfüllen hat, schien es mir wünschenswert, das in verschiedenen Tierklassen vorkommende Ovomukoid systematisch zu untersuchen und miteinander zu vergleichen.

Dank der Überlassung einer grösseren Anzahl von Eiern der Meerschildkröte, habe ich im Anschluss an bereits mitgeteilte Beobachtungen bei diesen Eiern den Versuch unternommen, einerseits den Gehalt des Eierklars an Ovamukoid in ganz verschiedenen Entwicklungsstadien zu ermitteln und andererseits die Frage zu

prüfen, ob auch das Ovomukoid durch Diastase gespalten wird.

Bei Gelegenheit dieser Untersuchung war ich unter Benutzung der für die Ovomukoidversuche nicht gebrauchten Materialien imstande, das Verhalten des freien und gebundenen Cholins in verschiedenen Entwicklungsstadien zu untersuchen.

I. ÜBER DAS VERHALTEN DES IM MEERSCHILDKRÖTENEI BEI DER BEBRÜTUNG VORHANDENEN OVOMUKOIDES.

A. *Darstellung des Ovomukoides aus frischen und bebrüteten Eiern der Meerschildkröte.*

Eierklar wurde mit dem 4 fachen Volumen Wasser gut durchgeschüttelt, in das $1\frac{1}{2}$ fache Volumen siedenden Wassers gegossen, unter Zusatz von Essigsäure bis zur schwach sauren Reaktion unter gutem Umrühren auf freiem Feuer, zuletzt bis zum starken Sieden erhitzt und abfiltriert. Das Filtrat, das keine Fällung mit Quecksilberchlorid und Salpetersäure ergab, wurde anfangs auf freiem Feuer, dann auf dem Wasserbade auf ein kleines Volumen eingedampft, abfiltriert und in die 5 fache Menge absoluten Alkohols gegossen. Der Niederschlag wurde mehrmals in Wasser gelöst und wieder mit absolutem Alkohol gefällt, filtriert, mit Äther nachgewaschen und so entwässert.

Um eine Vorstellung vom Ovomukoidgehalt des Eiweisses zu erhalten, habe ich zunächst den Versuch unternommen, die organi-

TABELLE I.

Bebrütungs- dauer in Tagen	Organische Trocken- substanz g	Ovomukoid g	Relation des Ovomukoides: organischer Trockensubstanz
Frisch	15,710	5,066	1:3,1
15	18,577	3,033	1:6,1
30	12,219	2,720	1:4,4
45	6,798	1,720	1:3,9

sche Trockensubstanz und das Ovomukoid in ganz verschiedenen Entwicklungsstadien des Meerschildkröteneies zu verfolgen. Dabei wurden zu jedem Versuch 100 Eier verwendet.

Hieraus ergeben sich folgende Werte für die organische Trockensubstanz resp. für das Ovomukoid in dem Eierklar von 100 Eiern (vgl. die Tabelle I).

Das Ovomukoid ist also der organische Bestandteil des Eierklars des Meerschildkröteneies, der in Bezug auf die Menge den ersten Platz einnimmt.

Um zu entscheiden, ob das Ovomukoid sich während der Bebrütung in seiner Zusammensetzung und Eigenschaft ganz gleichmässig verhält, oder ob es dabei Veränderungen erfährt, habe ich zunächst die Elementaranalyse der Präparate ausgeführt.

Die Elementaranalysen ergaben folgende Werte:

TABELLE II.

Auf aschenfreier Substanz %	Präparat aus frischen Eiern	Präparat aus 30 Tage lang bebrüteten Eiern	Präparat aus 45 Tage lang bebrüteten Eiern
C	48,26	46,41	52,16
H	7,08	7,28	7,37
N	12,90	11,94	13,05
S	2,90	—	—

B. Über die Wirkung der Diastase auf das Ovumukoid des Meerschildkröteneies.

Sagara (1929) hat im hiesigen Institut ganz einwandfrei das Vorkommen der Diastase sowohl im Eiweiss als auch im Dotter und Embryo der Meerschildkröte nachgewiesen. So war es von hohem Interesse die Frage zu prüfen, ob auch das Ovomukoid durch Diastase gespalten wird.

0,5 g des Ovomukoides wurde in 50 ccm Wasser gelöst, mit

50 ccm Diastaselösung (0,5 g Takadiastase in 50 ccm H_2O) unter Zusatz von Toluol bei $37^\circ C$ im Brutschrank digeriert. Nach einer bestimmten Frist wurde der abgespaltene Traubenzucker nach Bertrand ermittelt. Bei den Kontrollversuchen wurde festgestellt, wieviel Traubenzucker in der wässerigen Fermentlösung allein auftritt, während in der rein wässerigen Ovomukoidlösung keine Hydrolyse stattfand. Das Wasserstoffionenoptimum der Diastase-reaktion wurde bei pH 7,09 angenommen.

- | | |
|-------------------------------------|------------------------|
| a) Diastaselösung + Ovomukoidlösung | 160,6 mg Traubenzucker |
| b) Diastaselösung | 114,7 mg „ |
| c) Ovomukoidlösung | 0 „ |

Diese Versuche zeigen, dass die Diastase einen Teil der Kohlenhydratgruppe aus Ovomukoid abspalten kann.

Wie aus folgender Tabelle ersichtlich ist, ist das Verhalten des Ovomukoides gegen Diastase bei verschiedenen Entwicklungsstadien fast gleich. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Ovomukoid sich während der Bebrütung in seiner Zusammensetzung beinahe gleichmässig verhält.

Die Ansätze hatten die folgende Zusammensetzung:

50 ccm 1%ige Ovomukoidlösung,
50 ccm 1%ige Takadiastaselösung,
5 ccm Toluol.

TABELLE III.

Präparat aus	pH	Digestions- dauer	Menge des aus Ovomukoid abgespaltenen Traubenzuckers mg
frischen Eiern	7,09	3 Tage	30,3
30 Tage lang bebrüt. Eiern	„	„	31,8
45 Tage lang bebrüt. Eiern	„	„	30,3

II. ÜBER DAS VERHALTEN DES FREIEN UND GEBUNDENEN CHOLINS BEI DER BEBRÜTUNG DES MEERSCHILDKRÖTENEIES.

Sowohl vom Standpunkt des Phosphatidstoffwechsels als auch der Schwangerschaftstoxikose hat Y. Nakamura (1928) im hiesigen Institut das Verhalten des freien und gebundenen Cholins in ganz verschiedenen Entwicklungsstadien des Hühnereies untersucht. Er kam zu der Anschauung, dass die Menge des im Hühnerei vorkommenden freien Cholins, welches sich nur im Dotter findet und bei 9 tägiger Bebrütung den Minimalbetrag erreicht, bei weiterer Bebrütung allmählich zunimmt, während das im Hühnerei gebunden vorhandene Cholin dabei eine Abnahme erfährt.

Um einen Beitrag zur Erforschung des Cholinstoffwechsels bei dem sich entwickelnden Embryo zu liefern, habe ich diese an den Hühnereiern gemachten Erfahrungen auf Reptilieneier angewandt und weiter entwickelt.

A. *Das freie Cholin.*

Die Bestimmung des freien Cholins selbst geschah folgendermassen: Der gesamte Einhalt wurde mit heissem Alkohol dreimal extrahiert, der vereinigte Alkoholextrakt durch Destillation unter vermindertem Druck verdampft und der Rückstand in Wasser gelöst und mit Äther stark geschüttelt. Die wässrige Lösung wurde dann unter Zusatz von Schwefelsäure mit Kaliumquecksilberjodidlösung gefällt. Nach 24 Stunden wurde der Niederschlag auf dem Filter gesammelt, sorgfältig ausgewaschen und unter Schwefelsäurezusatz durch Silberoxyd zerlegt. Nach Abfiltrieren des Jodsilbers wurde das Filtrat durch Barytwasser von überschüssiger Schwefelsäure und Silbersulfat befreit, der Baryt durch Einleiten von Kohlensäure und Erwärmen entfernt und die wässrige Lösung mit Salzsäure genau neutralisiert. Jetzt wurde die Lösung unter vermindertem Druck eingedampft und mit Alkohol ausgezogen. Die alkoholische Lösung wurde wieder ein-

gedampft und mit absolutem Alkohol extrahiert. Diese Prozedur wurde so oft wiederholt, bis der Rückstand in absolutem Alkohol ganz gelöst war. Aus der alkoholischen Lösung wurde mittels Platinchlorids das Doppelsalz der Base isoliert und aus Wasser umkrystallisiert. Nach mehrmaligem Umkrystallisieren erhielt man die Platinverbindung in Form orangeroter Tafeln oder Prismen; ihr Schmelzpunkt lag zwischen 222°C bis 227°C .

Die Resultate sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

TABELLE IV.

Bebrütungs- dauer	Zahl der verwendeten Eier	Menge des Cholin- platinchlorides g	Menge des freien Cholins auf ein Ei berechnet mg
Frish	10	0	0
15 Tage	10	0	0
30 Tage	10	0,1110	4,51
45 Tage	10	0,0385	1,56

B. Das Gesamtcholin.

Der gesamte Eiinhalt wurde mit heissem Alkohol erschöpfend extrahiert, der vereinigte Alkoholextrakt mit alkoholischer Barytlauge verseift und zum Trockenene eingedampft. Der Rückstand

TABELLE V.

Bebrütungs- dauer	Zahl der verwendeten Eier	Menge des Cholin- platinchlorides g	Menge des Gesamt- Cholins auf ein Ei berechnet mg
Frish	10	0,4377	17,78
15 Tage	10	0,4022	16,34
30 Tage	10	0,4577	18,60
45 Tage	10	0,2318	9,42

wurde in Wasser aufgenommen, der überschüssige Baryt durch Einleiten von Kohlensäure und schliesslich unter Zusatz von Schwefelsäure befreit und die schwefelsaure Lösung wurde dann mit Kaliumquecksilberjodidlösung gefällt. Die weitere Verarbeitung geschah genau so wie bei dem freien Cholin.

Die Befunde sind in der Tabelle V. verzeichnet. Durch Subtraktion des vorher gefundenen freien Cholins von dem Gewichte des Gesamtholins wurde die Menge des gebundenen gefunden.

Aus den Versuchsergebnissen geht hervor, dass die Menge des freien Cholins im Vergleich zu dem Gesamtholin sehr klein ist. Es fällt auf, dass bei 45 tägiger Bebrütung eine starke Abnahme des Gesamtholins erfolgt. Die Frage, in welcher Weise das Cholin bei einem späteren Entwicklungsstadium des Embryos umgewandelt wird, steht noch dahin.

LITERATUR.

- Komori, Y. (1926); Journ. of Biochem. **6**, 14.
Nakamura, Y. (1928); Zeits. f. Physiol. Chem. **177**, 36.
Sagara, J. (1929); Journ. of Biochem. **10**, 379.

ÜBER DAS VERHALTEN DER HEXON- UND PURINBASEN, DIE WÄHREND DER BEBRÜTUNG IN FREIER FORM IM HÜHNEREI VORHANDEN SIND.

VON

MASAO TAKAHASHI.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der medizinischen Akademie in Nagasaki. Vorstand: Prof. Dr. M. Tomita.)

(Eingegangen am 6. April 1929.)

Das Problem, welche Aminosäuren als Bausteine für Körper-eiweiss unentbehrlich sind und welche ausserdem als Aufbau-material zur Bildung wichtiger Stoffe Verwendung finden, die bei bestimmten Organfunktionen eine bedeutsame Rolle spielen, hat unter den gesamten Forschungsgebieten des Aminosäurenstoff-wechsels einen hervorragenden Platz eingenommen. Besonders steht die Frage im Brennpunkt unseres Interesses, wie sich die freien Hexon- und Purinbasen bei dem Wachstum des keimenden Embryos verhalten, weil die Nukleoproteide, welche einen wesentlichen Bestandteil des Zellkerns darstellen, durch quantitativ grössere Beteiligung der Hexon- und Purinbasen am Aufbau ausgezeichnet sind.

Aus diesem Grunde habe ich mich im Anschluss an eine frühere Arbeit von Sendju (1925) und Sagara (1928) mit der Frage beschäftigt, wie die freien Hexon- und Purinbasen sich bei der Bebrütung des Hühnereies verhalten.

Als Untersuchungsmaterial benutzte ich möglichst gleichgrosse Eier, die von unter gleichen Bedingungen ernährten Hennen derselben Rasse in einer bestimmten Frist gelegt waren, und zwar verwendete ich zum Teil frisch befruchtete Eier und zum Teil bebrütete Eier, die 5, 9, 14, 17 und 19 Tage alt waren.

Der gesamte Einhalt wurde zerkleinert, mit Wasser durch-

gerührt und dann mit Äther stark geschüttelt, um das Fett zu beseitigen.

Die entfettete Masse wurde unter Herstellung schwach saurer Reaktion durch verdünnte Essigsäure beim Zusatz von essigsaurem Natrium in der Hitze koaguliert. Das Filtrat wurde eingedampft, mit Schwefelsäure versetzt, bis der Prozentgehalt 5% H_2SO_4 betrug, und mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der Phosphorwolframsäureniederschlag wurde durch Baryt zersetzt und der überschüssige Baryt durch Kohlensäure abgeschieden. Das Filtrat von kohlensaurem Barium wurde stark eingeeengt, mit Salpetersäure angesäuert und dann mit 10% iger Silbernitratlösung gefällt. Die Silberfällung wurde in Wasser aufgeschwemmt und mit Schwefelwasserstoff behandelt. Das Schwefelsilber wurde abfiltriert und das Filtrat im Wasserbad auf ein bestimmtes Volumen eingeeengt. Mit einem aliquoten Teil wurde der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt und als Purin-N festgestellt. Aus dem Filtrat der Silberfällung wurde Histidin, Arginin und Lysin nach dem Verfahren von Kossel und Edlbacher (1920) getrennt, das Histidin als Pikrolonat und die anderen als Pikrat isoliert.

Die Versuchsergebnisse werden in den folgenden Tabellen zusammengestellt.

I. PURINBASEN.

Bebrütungs- dauer in Tagen	Zahl der verwendeten Eier	Gewicht des verwendeten Eiinhalt g	Purin-N-menge	
			g	auf ein Ei berechnet, mg
Frisch	30	1350	0,0014	0,04
5	31	1546	keine Fällung	—
9	32	1570	0,0014	0,04
14	18	815	0,0070	0,38
17	33	1250	0,0560	1,69
19	33	1385	0,0315	0,95

Vergleicht man die Befunde mit denen des Sendju'schen Versuches (a.a.O.), so findet sich besonders in den späteren Stadien der Bebrütung eine grosse Differenz der Purinmenge. Dieser Mengeunterschied deutet darauf hin, dass eine bedeutende Quantität der Purinstoffe durch Säurehydrolyse der Nukleinsäuren aufgespalten wird, welche sich während der Bebrütung mit fortschreitender Entwicklung des Embryos vermehren.

II. HEXONBASEN.

A. *Histidin.*

Bebrütungs- dauer in Tagen	Zahl der verwendeten Eier	Gewicht des verwendeten Einhaltes g	Histidin-Menge	
			g	auf ein Ei berechnet. mg
Frisch	30	1550	0,0041	0,13
5	31	1546	0,0037	0,12
9	32	1570	0,0007	0,02
14	18	815	0,0035	0,19
17	33	1250	0,0068	0,20
19	33	1385	0,0126	0,38

B. *Arginin.*

Bebrütungs- dauer in Tagen	Zahl der verwendeten Eier	Gewicht des verwendeten Einhaltes g	Arginin-Menge	
			g	auf ein Ei berechnet. mg
Frisch	30	1550	0,0307	1,02
5	31	1546	0,0589	1,90
9	32	1570	0,0741	2,31
14	18	815	0,0613	3,40
17	33	1250	0,1330	4,03
19	33	1385	0,1701	5,15

C. Lysin.

Bebrütungs- dauer in Tagen	Zahl der verwendeten Eier	Gewicht des verwendeten Eiinhalt g	Lysin-Menge	
			g	auf ein Ei berechnet, mg
Frisch	30	1550	0,1965	6,55
5	31	1546	0,2163	6,97
9	32	1570	0,3003	9,38
14	18	815	0,2876	15,97
17	33	1250	0,5379	16,30
19	33	1385	0,9026	27,35

Nach dem Resultate der Untersuchung über Hexionbasen handelt es sich um eine stetige Zunahme dieser Stoffe bei der Bebrütung des Hühnereies. Vor allem häuft sich das Lysin in der letzten Hälfte der Bebrütungsperiode in grosser Quantität an.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Während der Bebrütung des Hühnereies tritt eine Neubildung der Purinbasen ein.

2. Die Menge des im Hühnerei vorhandenen freien Histidins ist sehr gering und beträgt 0,1 mg, nimmt aber bei der Bebrütung allmählich zu und erreicht bis zu 0,38 mg.

3. Im Vergleich mit dem Histidin beträgt die Argininmenge ungefähr das 10 fache, und nimmt auch bei der Bebrütung in derselben Relation zu.

4. Die Menge des im frischen Hühnerei frei vorhandenen Lysins beträgt über 6 mg und eine Vermehrung dieses Stoffes erfolgt in der letzten Hälfte der Bebrütungsdauer in viel bedeutenderem Masse als in der ersten Hälfte. Bei 19 tägiger Bebrütung erreicht der Lysingehalt seinen Höhepunkt. Er beträgt 27,35 mg.

LITERATUR.

- Kossel, A. und Edlbacher, S. (1920); Zeits. f. physiol. Chem. **110**, 241.
Sagara, J. (1928); Zeits. f. physiol. Chem. **178**, 298.
Sendju, Y. (1925); Journ. of Biochem. **5**, 407.

THE FATE OF HIPPURIC ACID IN THE CHICKEN ORGANISM.

By

MASAO TAKAHASHI.

(From the Department of Physiological Chemistry, the Medical College, Nagasaki. Director: Prof. Dr. M. Tomita.)

(Received for publication, April 6, 1929)

It is a well known fact that in the bird and the mammal there are marked differences in the synthetic processes as far as concerns the detoxication of benzoic acid, namely hippuric acid formation in the case of the mammal and ornithuric acid synthesis in the avisorganism. J. Yoshikawa (1910) has already stated by his experiments that the chicken does not excrete hippuric acid as detoxicating product, although large doses of benzoic acid and glycocoll are administered to it. More recently my work (1928) has clearly shown that the embryo in 14th to 18th day of developing hen eggs are able to synthesize ornithuric acid in order to detoxicate benzoic acid injected into it, but no traces of hippuric acid are detected at any developing period. What is the reason for such difference in the detoxicating process between these two kinds of animal organisms? One way of solving this problem, is to study the fate of hippuric acid in the chicken and the behaviour of ornithuric acid in the mammal. My experimentation described below followed at first the fate of hippuric acid in the chicken after the oral administration, then, showed which organ contains an enzym, which hydrolyses hippuric acid into benzoic acid and glycocoll.

The experimental result shows that hippuric acid when fed to chicken can be recovered almost in an amount of 90% from the urine and that 10% of it is excreted in the excreta in a form of benzoic acid. This spitting process holds much better in the kidney than in that of the liver and muscle.

By the artificial perfusion with blood through the kidney, the hippuric acid is sure to be decomposed into benzoic acid and glycocoll, even though but a small amount of benzoic acid is to be found. The whole series of the experiments may be represented as follows.

EXPERIMENTAL.

I. The Feeding experiment.

The chicken were kept in cages. Each chicken was given per os 1 gm. daily dose of hippuric acid as sodium salt. The total amount given to five chickens during four days was 18 gm. The excrement was collected during the following 24 hours and evaporated to dryness on the water bath. It was extracted with hot alcohol and filtered. This alcoholic extract was evaporated to sirup. Such treatment with alcohol was repeated three times. This sirup was taken up with a small quantity of water, and acidified with sulphuric acid. By shaking this aqueous solution with ethyl acetate in a separatory funnel for a period of many hours, all benzoic and hippuric acid go into ethyl acetate layer. The aqueous solution was then drawn off, and the ethyl acetate was washed with a few cc. of distilled water. On evaporating the ethyl acetate solution a large amount of crystallized mass separated out. These crystals were dissolved in the petroleum ether. Upon standing in the cold this solution gradually deposited some crystallized substances. This material weighed 1,87 gm. and the investigation showed it to consist of benzoic acid. The residue of petroleum ether was then dissolved in a large quantity of hot water and filtered, if necessary, it was decolorized with a small pinch of charcoal. After the filtrate had evaporated and cooled the purified hippuric acid melting at 187°C appeared in it. The yield was 14,09 gm.

II. The experiment with the organ.

The organ which was taken out from a freshly killed chicken was minced with scissors, pestle and glass-mortar. This minced organ was mixed with 50 cc. of water and 10 cc. of 10% sodium hippurate.

Chloroform and toluene were added to prevent bacterial action. This material was kept in the incubator of 37°C for one week. Then the content of the bottle was deproteinized with heat and acetic acid, following the same method employed at the feeding experiment. By such treatment, benzoic acid was estimated. For the determination of glycocoll, the watery part of ethyl acetate was used. The solution was freed from sulphuric acid with barium hydroxyd and the clear filtrate of barium sulphate was evaporated and filled to a definite amount, from which amino nitrogen was estimated by the Van Slyke method and then calculated for glycocoll. Each experiment with the organ was carried out simultaneously with two controls. The first control was attempted under the same manner as the original, except only without hippuric acid added, in order to determine amino nitrogen which is yielded by the autolysis of an organ. These control values were deducted from the original figures. As a second one, the organ mass was boiled for one hour and treated under the same condition as above to show that the boiling procedures result in the destruction of the hydrolysing power of the histozyme in the organ tissue.

The figures of the experiments with the various organs obtained are as follows:

Organ	Amount of organ used. gm.	Amount of hippuric acid added. gm.	Benzoic acid			Glycocoll		
			Calculation. gm.	Found		Calculation. gm.	Found	
				mg.	%		mg.	%
Kidney	10	0,5	0,3497	0,2446	71,79	209,9	108,2556	51,69
"	"	"	"	0,2464	72,32	"	154,3351	73,70
"	"	"	"	0,2770	81,30	"	188,1905	89,87
Liver	20	1,0	0,6815	0,1148	16,84			
"	"	"	"	0,1266	18,57			
"	"	"	"	0,1878	27,56			
"	"	"	"	0,1554	22,80			
"	"	"	"	0,1780	26,12			
"	"	"	"	0,1930	28,32			
Intestine	20	"	"	0,0160	2,34	418,9	7,9046	1,88
"	"	"	"	0,0130	1,90	"	7,9046	1,88
Spleen	3	"	"	0,0130	1,90	"	3,1125	0,73
"	"	"	"	0,0150	2,20	"	1,5562	0,37
Lung	15	"	"	0,0204	2,99	"	13,9601	3,33
"	"	"	"	0,0210	3,08	"	9,9715	2,38
Muscle	20	"	"	0,0836	12,26	"	58,1545	13,58
"	"	"	"	0,0804	11,79	"	54,3025	12,71
Pancreas	5	"	"	—	—	"	—	—
"	"	"	"	—	—	"	—	—

The present experiment indicated that the amino nitrogen yield by autolysis of a liver in a case of the control trial was greater than that of original experiment which contained an amount of amino nitrogen of amino acid based upon the decomposition of hippuric acid and the autolysis of tissue. Whether this is due to the paralyzatoric action of glycocoll upon the autolysis in the liver or not could not be determined.

III. The perfusion experiment.

The perfusion fluid was made of the mixture of normal salt solution (0.9%) and the blood of a chicken which was whipped free

from clot and filtered through cloth. When all the apparatus of perfusion was arranged, the chest and the abdomen of a chicken were quickly opened by medium incision. After tying all the blood vessels except the arteries and veins of the kidney in which two cannula are fixed, the kidney was freed as soon as possible with great care from other organs and tissue. Then the perfusion solution with 10 cc. of 10% sodium hippurate was flowed for one hour through the kidney in the usual manner. This perfusion fluid was analysed by the same treatment as that used previously and determined benzoic acid weighed 0,0216 gm.

REFERENCES.

- Takahashi, M. (1928): Zeits. f. physiol. Chem. **178**, 294.
Yoshikawa, J. (1910): Zeits. f. physiol. Chem. **68**, 79.

STUDIES ON TYROSINASE.

I. The oxidation and reduction potential of the tyrosinase system.

By

DAISABURO OKUYAMA

*(From The Laboratory of Medical Chemistry, Kyushu Imperial University,
Director: Prof. Dr. K. Kodama).*

(Received for publication, April 12, 1929.)

INTRODUCTION.

A series of elaborate experiments on tyrosinase carried out by Raper and his coworkers (1923-1927) have thrown much light upon the chemismus underlying the formation of melanin in the animal body. So, it is almost settled that the first attack of tyrosinase on tyrosine is the introduction of a second hydroxy-group in ortho-position to the first in the benzol ring. The experimental evidence, which lead to this conclusion, was given by the above investigators by isolating 3-4-dioxyphenylalanine from the reaction-products of tyrosinase on tyrosine and homo-catechol, as a compound with aniline, from those of tyrosinase and p-cresol.

In these instances, tyrosinase is active only in the presence of air, namely oxygen, so that its action is generally understood to be of an aerobic nature. It is, however, to be decided whether it lies in the activation of hydrogen or of oxygen, in other words whether it acts in the Wieland's sense or in the Warburg's. McCance (1925) observed that tyrosine, when dissolved in a certain strength of alkali, was able to decolourise methylenblue in a sufficient length of time. He also noticed that p-cresol and tyrosinase, when mixed with glycin, could reduce methylenblue within a few minutes, at 37.5°C. These facts suggest that the activation of hydrogen may intervene in the initial stage of the melanine formation and in similar cases.

It is the purpose of this paper to give additional evidence in support of the observation of McCance, based on the experimental facts revealed by the study of the oxidation and reduction potential of the various systems, in which tyrosinase displays an unequivocal role in the reaction involved.

Experiments.

The preparation of the tyrosinase.

The tyrosinase used in this experiment was prepared from potato skin in the following manner.

The crude materials were crushed with a meat chopper, and the juice was pressed out by means of the pressing machine, and then filtered through filter paper to free them from starch. The filtrate was mixed with an equal volume of 95% alcohol. The precipitate which resulted was collected on a buchner funnel, and dissolved again in a quantity of water of half the volume of the original juice. To this solution was added an equal volume of half saturated ammon-sulphate. The whole solution was shaken for 1 hour, and then filtered. A clear, but brown coloured filtrate was obtained. This was mixed with an equal volume of saturated ammon-sulphate solution, upon which a white grey precipitate was produced. The precipitate was collected by centrifuge, dissolved again in a small amount of water, and submitted to dialysis against water until it became free from sulphate reaction. A last trace of salt, if necessary, was freed by electrodialysis.

The enzyme prepareate, thus obtained, showed an enormous activity and when kept in an ice chest, in a state of solution, retained its strength undiminished for a considerable length of time.

100 cc. of this solution contained 0.19 gm. of dry substance, its nitrogen-content being 0.1005%, determined after Folin and Former (1912) and the iron content 0.39% after R. P. Kennedy (1927).

To measure the oxidation and reduction potential, the method described by Kodama (1926) was followed. The reaction vessel

was made of glass of 15 cc. capacity (3×8) with a rubber stopper. The latter had 4 bores, for the electrode, agar salt bridge, gas inlet and outlet. The electrode was made of thick gold wire of 2 cm. long, and before use was cleaned in water and ignited to red heat in a flame of redestilled methyl-alcohol.

The electric potential was measured by the unipivote potentiometer of The Cambridge Instrument Co. at room temperature (27° – 292°C) using the saturated calomel cell as the reference electrode. From the observed value Eh was calculated in the usual way, taking the value of the saturated calomel cell $\div 245$ millivolt at the temperature of 28°C .

I. Experiment.

Reaction mixture:—

phosphate-buffer \div p-cresol \div tyrosinase \div glycine.

Into the reaction-vessel 3 cc. of M/5 phosphate buffer (pH 7.38) was introduced and nitrogen, purified with extreme precaution, was bubbled through at a rate of 50 bubbles per minute. When the potential showed a steady value, usually $\text{Eh} \approx 320\text{m.v.}$ 1 cc. of M/10 p-cresol solution, 1 cc. of the tyrosinase solution and 1 cc. of M/10 glycine solution were added, successively, under the precaution that the new addition was always done when the potential showed a steady value. The experimental result is illustrated in Fig. 1 where the abscissa represents Eh. and the ordinate time in minutes. The same experiments were repeated with the only difference that the order of the addition of the reactants was reversed, and the results are illustrated in Fig. 2 and 3.

It is apparent from Fig. 1 that p-cresol alone does not cause any appreciable change of the potential. On the addition of tyrosinase a transient rise, followed by a drop, was observable. The initial rise was of course produced by tyrosinase solution alone, which was, however, soon covered by the reductions process due to the interaction between the ferment and p-cresol. The

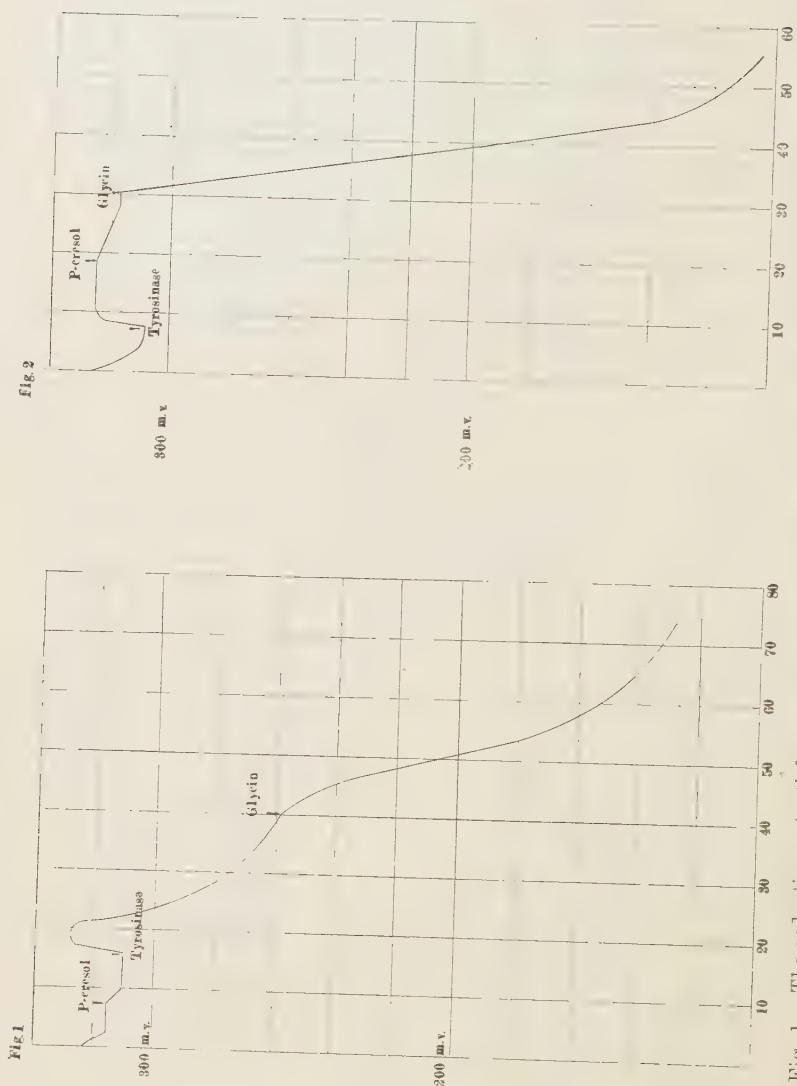
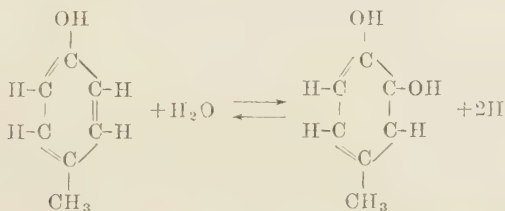




Fig. 3. The reduction-potential curve of buffer + glycine + p-cresol + tyrosinase.

chemismus may be interpreted in the following way, based on the postulation of Raper and his coworkers.



According to the electronic theory of Fry (1908) on the

constitution of benzol ring the $-H$ atom in ortho-position to $-OH$ may be charged negatively, so that in alkaline solution it has the tendency to be replaced by $-OH$ ion and the liberated $-H^-$ ion readily gives off 2 electrons to attain its more stable form $-H^+$. This tendency seems to be more predominant in the case of tyrosine, which will be discussed later.

Next, on the addition of glycine a remarkable drop was noted.

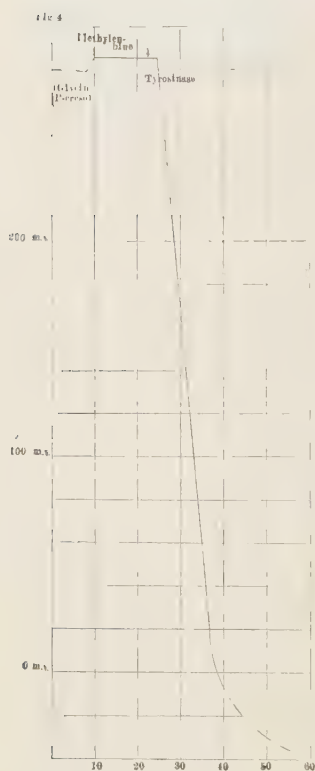


Fig. 4. The reduction-potential curve of buffer, p-cresol, glycine + methylenblue + tyrosinase.

A slight lowering due to glycine alone is not sufficient for the explanation of this drop and moreover, glycine + tyrosinase and glycine + p-cresol, as shown in Fig. 2 and Fig. 3 respectively, are not effective in bringing it about. The only explanation which may be given is by assuming that glycine + p-cresol gave rise to the substance of the high reductions potential by means of tyrosinase. The role of the latter in the chemismus involved, therefore, is the activation of hydrogen from glycine + p-cresol. The lowest potential attained, however, was $E_h + 140$ m.v. But when methylenblue was added it dropped to $E_h - 20$ m.v., (Fig. 4) which corresponds to 90% reduction of methylenblue at pH of this experiment. It seems rational to assume that the electro-chemical potential does not necessarily show the reduction or oxidation intensity in the case of biological substance, as discussed by Kodama (1926) on xanthin oxidase.

Fig. 1₂

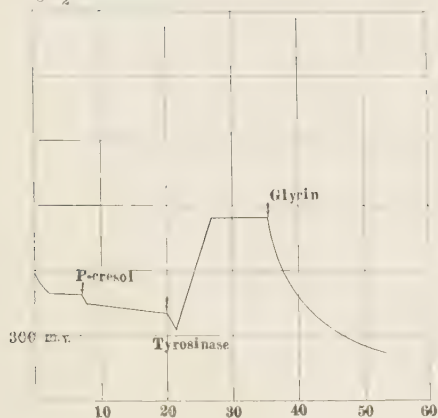


Fig. 1₂. The reduction-potential curve of buffer + p-cresol + tyrosinase + glycine.

Fig. 2₂

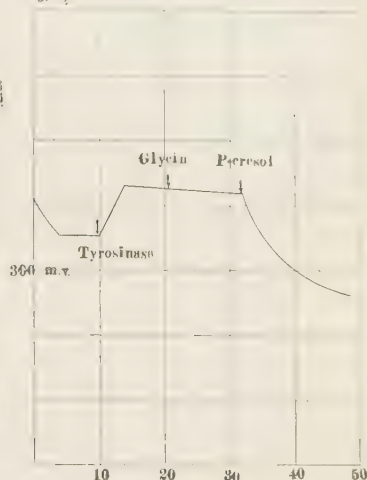


Fig. 2₂. The reduction-potential curve of buffer + tyrosinase + p-cresol + glycine.

Fig. 3₂

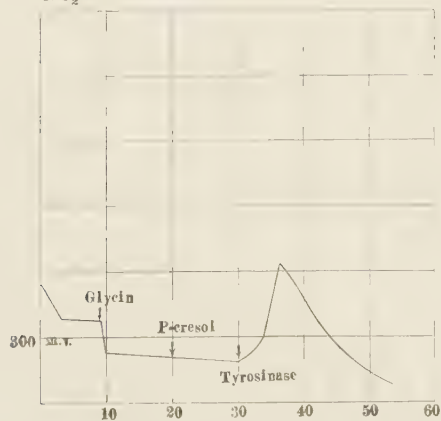


Fig. 3₂. The reduction-potential curve of buffer + glycine + p-cresol + tyrosinase.

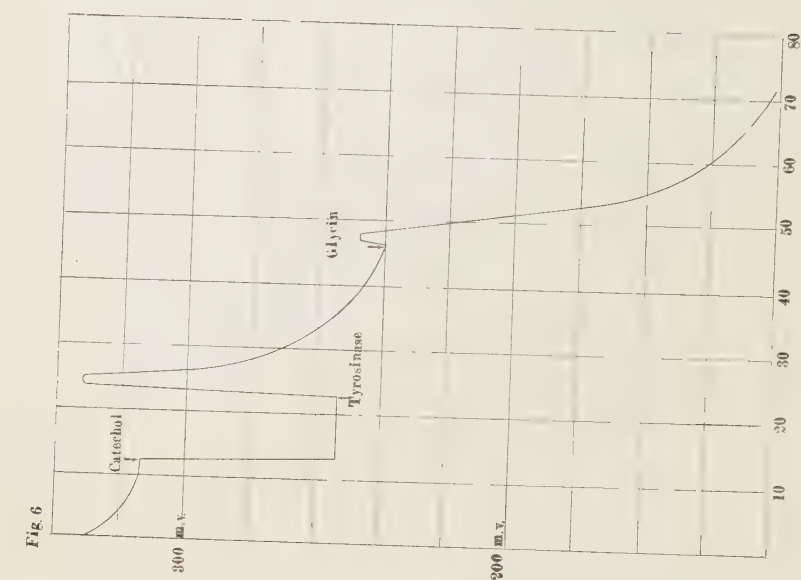


Fig. 5. The reduction-potential curve of buffer + catechol + glycine + tyrosinase.

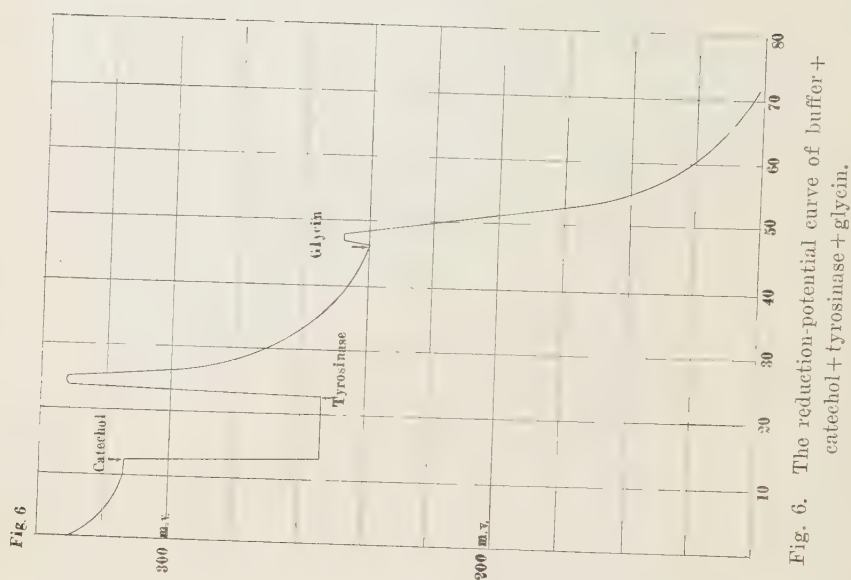


Fig. 6. The reduction-potential curve of buffer + catechol + tyrosinase + glycine.

The above experiments were repeated in ordinary air instead of the nitrogen medium. The results are indicated in Fig. 1₂, 2₂, 3₂.

In this case the rise of the curve on the addition of tyrosinase to p-cresol appeared slightly higher, but there was no drop directly following, and that on the addition of glycine was also of inconsiderable magnitude. These facts can be explained in a comprehensive manner by assuming that active hydrogen was readily combined with atmospheric oxygen, forming H_2O_2 and further water. The reaction system passed through varying stages of colour, blue, red and finally brown red, suggesting that the process is of a very complicate nature.

The oxygen-uptake, measured by Barcroft's differential manometer is about 2,0633 cc. at the standard condition by M/10 p-cresol and M/10 glycine. Roughly one molecule of oxygen corresponds to one molecule of p-cresol and glycine.

II. Experiment.

Reaction mixture:—

phosphate buffer + catechol + glycine + tyrosinase.

The experimental procedures are quite the same as in the foregoing experiment. The results are illustrated in Fig. 5 and 6.

Catechol itself showed a definite reduction potential, which was intensified by the addition of glycine, suggesting that some dehydrogenating process occurred. On the addition of tyrosinase, a sudden rise, followed by a rapid fall, was also noted. The facts might be interpreted in the same manner as in the previous experiment.

III. Experiment.

Reaction mixture:—

phosphate buffer + hydrochinon + glycine + tyrosinase.

Fig. 7 and 8 illustrate the results. The reductions potential due to hydroquinone alone is greater than that of catechol. On

Fig. 7

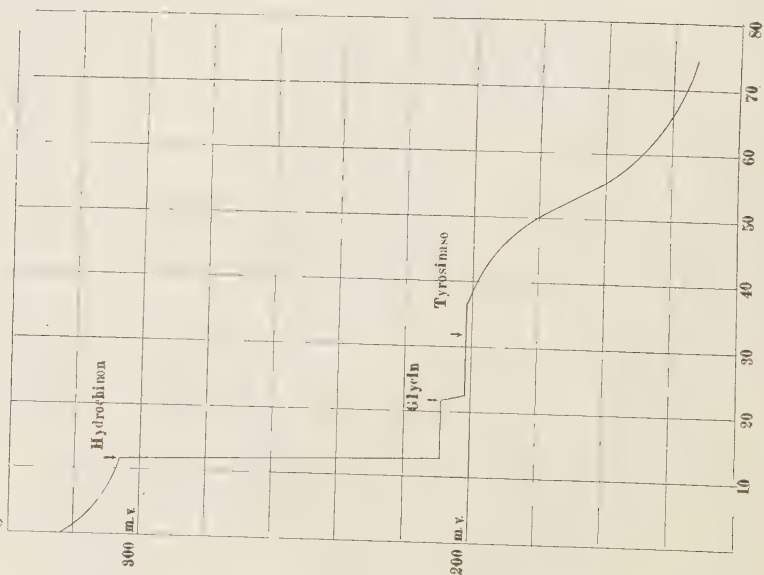


Fig. 7. The reduction-potential curve of buffer + hydroquinone + glycine + tyrosinase.

Fig. 8

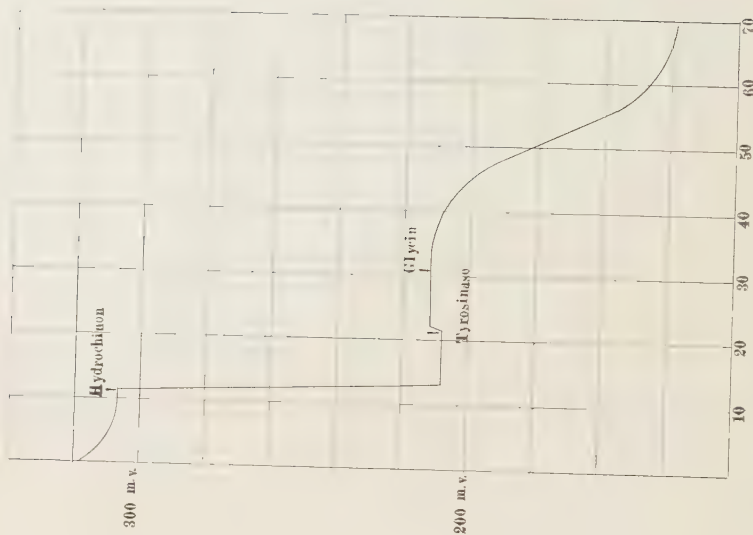


Fig. 8. The reduction-potential curve of buffer + hydroquinone + tyrosinase + glycine.

the addition of glycine, no marked change was observed, as in the case of catechol. Tyrosinase caused a reduction of the potential after a certain interval of time, but in a slow tempo, when compared with the former experiment.

IV. Experiment.

Reaction mixture:—

phosphate buffer + resorcinol + glycine + tyrosinase.

The experimental result is illustrated in Fig. 9. The signi-

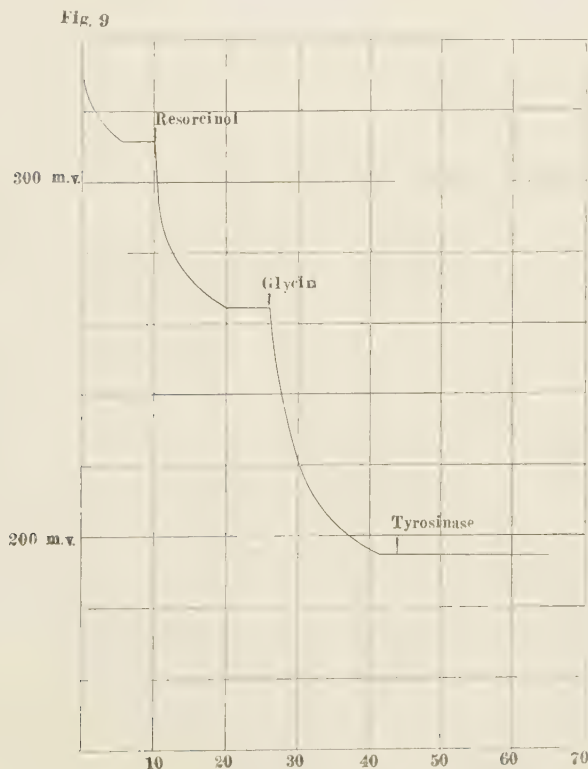


Fig. 9. The reduction-potential curve of buffer + resorcinol + glycine + tyrosinase.

Fig. 10

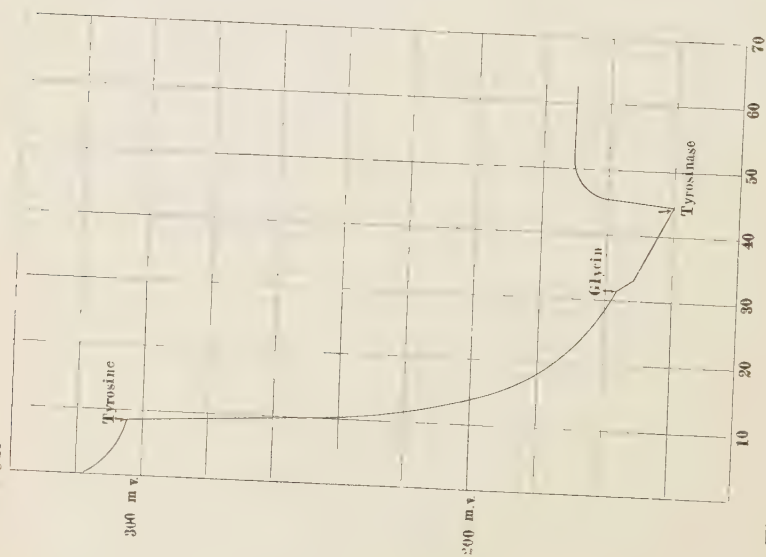


Fig. 10. The reduction-potential curve of buffer + tyrosine + glycine + tyrosinase.

Fig. 11

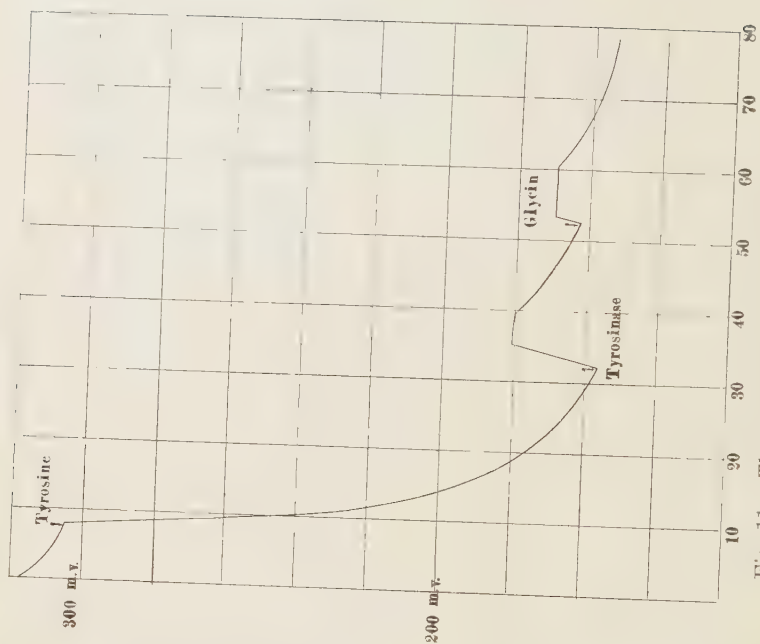


Fig. 11. The reduction-potential curve of buffer + tyrosine + tyrosinase + glycine.

ficant points in this experiment are the apparent drop on the addition of glycine, and the lack of change on the addition of tyrosinase.

V. Experiment.

Reaction mixture:—

phosphate buffer + tyrosine + glycine + tyrosinase.

Fig. 10, 11, demonstrate the results. It is remarkable that tyrosine itself exhibits a fairly strong reducing power. This is not modified appreciably by the addition of glycine and tyrosinase. In the medium of ordinary air this reductions-potential is of a quite inconsiderable order.

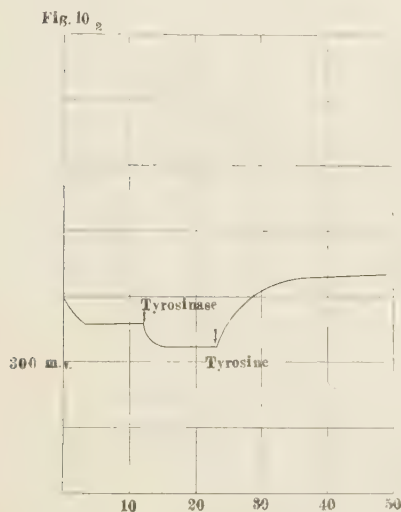


Fig. 10₂. The reduction-potential curve of buffer + tyrosinase + tyrosine in the O_2 -medium.

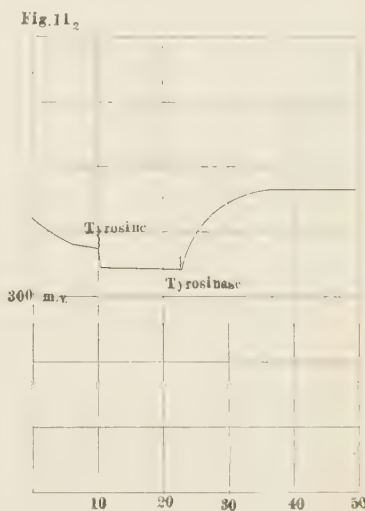


Fig. 11₂. The reduction-potential curve of buffer + tyrosine + tyrosinase in the O_2 -medium.

VI. Experiment.

Reactions mixture:—

phosphate buffer + dioxypheylalanine + glycine + tyrosinase.

Fig. 12, 13, illustrate the results.

Fig. 12

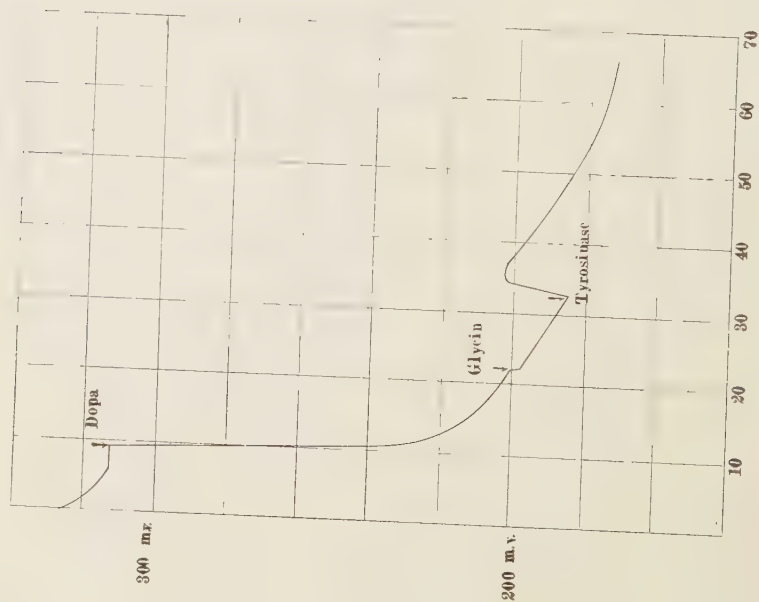


Fig. 12. The reduction potential curve of buffer + dopa + glycine + tyrosinase.

Fig. 13

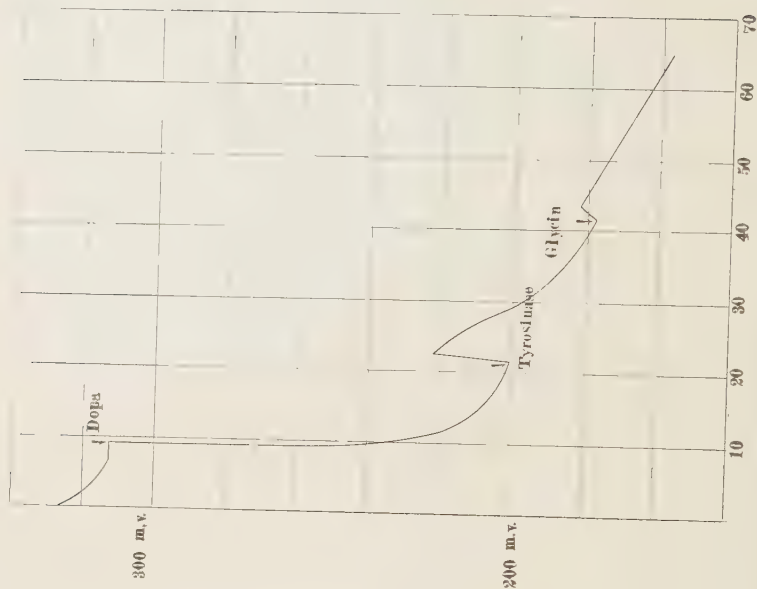


Fig. 13. The reduction potential curve of buffer + dopa + tyrosinase + glycine.

It is to be noticed that the general run of the curve is the same as in the case of tyrosine.

The addition of glycine and tyrosinase do not bring about any noteworthy change.

DISCUSSION.

From the observations on the oxidation and reduction potential of various tyrosinase systems it is almost certain that the essential feature of the action of tyrosinase is the catalysing of the anaerobic oxidation of phenols in the presence of aminoacid. Tyrosine manifests, however, a peculiar behavior in that it retains a high reduction potential without the aid of tyrosinase. This fact stands quite in agreement with the observation of McCance (1925) that tyrosine+tyrosinase did not reduce methylenblue any faster than tyrosine alone.

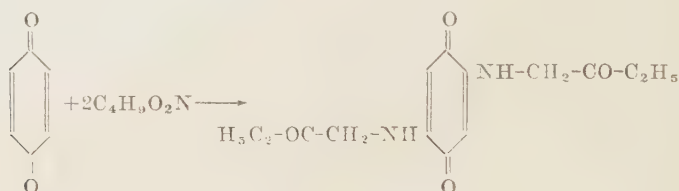
The reason why tyrosine shows this different nature apart from the usual monophenols can not be explained at present. At any rate, the readiness with which tyrosine can be converted into melanin by means of tyrosinase should be connected with its chemical constitution containing a phenol and an aminoacid group in its molecule and at the same time with the high reduction potential exhibited by it.

It is also interesting to note that E_h attained by tyrosine solution is lower than that by *p*-cresol. As briefly referred to above, the H atom attached to the ortho-position to the hydroxyl group in benzene nucleus might be more labile in the molecule of tyrosine than in that of *p*-cresol. Here lies the extreme easiness of the spontaneous blackening of alkaline tyrosine solution.

With regards to the behaviour of diphenols, it is noteworthy that resorcinol differs from hydrochinon and catechol in the fact that tyrosinase did not bring about any change in the presence of glycine in the medium of nitrogen. With resorcinol and glycine, no colour appeared in the presence of oxygen. The visible colour developed in other instances, therefore, should be necessarily cor-

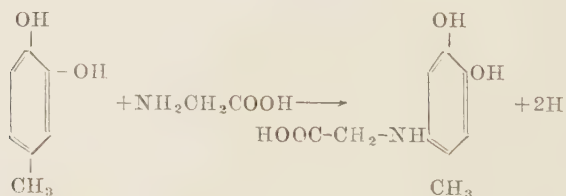
related with the high reductions potential caused by means of the tyrosinase.

E. Fischer and Hans Schrader (1910) obtained a crystalline compound by mixing glycine-ester and benzoquinon in alcohol solution. This substance was produced according to the following equation.



Recently Harger (1924) obtained a similar compound from the mixture of hydrochinon and aliphatic amine in the presence of air.

From these experimental facts it seems to be very likely that homo-catechol may react with glycine and give off active hydrogen in the following manner.



SUMMARY.

1. Tyrosinase gives a high reduction potential with p-cresol and glycine in nitrogen-gas. In the presence of oxygen, this is not so significant.
2. Tyrosine itself shows a sufficiently high reductions potential, which is not intensified by tyrosinase, even in presence of glycine.
3. The reduction potential of catechol and hydroquinone, but not

that of resorcinol is increased by tyrosinase in the presence of glycin.

REFERENCES.

- Fischer, E. and Schrader, Hans (1910): *Ber. d. Deut. Chem. Gesellschaft*, **43**, 525.
Folin-Former (1912): *J. of Biol. Chem.* **11**, 493.
Fry, H. S. (1908): *J. Amer. Chem. Soc.* **30**, 34.
Hager (1924): *J. Amer. Chem. Soc.* **46**, 2540.
Kenedy, R. P. (1927): *J. of Biol. Chem.* **74**, 385.
Kodama, K. (1926): *Bioch. Jl.* **20**, 1095.
McCance (1925): *Bioch. Jl.* **19**, 1022.
Raper, H. S. (1923-1927): *Bioch. Jl.* **17**, 454; **19**, 84, 92, 911; **20**, 69, 735; **21**, 89, 1370; *Fermentforschung* **9 J**, 206.

BIOCHEMICAL STUDIES ON THE AURICULO- VENTRICULAR JUNCTIONAL SYSTEM OF HEART.

I. The Glycogen content.

By

KAGEYU YAMAZAKI.

*(From the Institute of Medical Chemistry, Kyushu Imperial University,
Fukuoka. Director: Prof. Keizo Kodama.)*

(Received for publication, April 12, 1929.)

INTRODUCTION.

Nagayo (1908) first pointed out, using the method of Best, that the auriculo-ventricular junctional system of sheep, calf, ox, pig and dog's heart contains an abundance of glycogen, which renders its histochemical differentiation from the surrounding tissue easy. Mönckeberg (1908) also proved that this is the case with that of the human heart.

The above finding has been subsequently confirmed by many investigators and is believed to be one of the distinguished properties of this bundle.

What significance is attached to this fact from the standpoint of the function of this tissue, is still an open question. Though the muscle fibre of this tissue is rich in sarcoplasm and poor in muscle fibrilles yet it was demonstrated by Ishihara and Nomura (1923) this it undergoes an automatic and periodic contraction. Moreover it is usually assumed that the rate of conduction in the Purkinje fibre, which constitutes the distal part of the bundle, is far greater than that of the ventricular muscle. Katsunuma (1924) also confirmed that indophenol reaction of this conducting system, when tested histochemically, shows an outstanding intensity. These facts may favour the view that a brisk metabolic process

takes place in the system. But how to correlate the high storage of glycogen with this metabolic activity is a difficult question.

Putting aside this problem for a while, notice should be made first of all of the fundamental question whether Best's method of glycogen test can give an unmistakable result or not. Best gives the following points in support of his test, namely:

- 1) the substance, which can be dyed with carmin, combines also with iodine, giving a typical colour of iodine-glycogen.
- 2) the substance under consideration can be digested away by ptyalin at the temperature of 37°C, so that the tissue so treated no longer gives the carmin-reaction.

Neukirch (1910) claims, however, that this microscopical glycogen test sometimes gives an absurd result. For instance, the glycogen in leucocyte can be dyed with iodine intensely, but not at all with carmin. Romieu (1927) also made the observation that lecithin gave the positive colour reaction. Quite recently, S. Buadze and E. Wertheimer (1928) carried out the quantitative determination of glycogen content of the conducting system of horse and ox heart and came to the conclusions that 1) the glycogen content of the ventricular muscle of the ox vanished too rapidly after death to admit the quantitative determination; 2) this was not the case with the horse, so that a reliable result was obtained, which shows, quite in contradiction to the view generally held, that glycogen content of the conducting system is far inferior to that of heart muscle; and 3) this can not be ascribed to the rapid breakdown due to the metabolic process occurring in the tissue, because the oxygen uptake, measured by Barcroft's differential manometer, betrayed rather a feeble oxydation.

From what has been mentioned above it is clear that the glycogen content of the conducting system of heart awaits re-examination and if possible, the divergency between the histological and chemical results should be explained. The present paper chiefly deals with these problems.

II. THE METHOD OF GLYCOGEN DETERMINATION AND THE SAMPLING OF THE MATERIAL.

The glycogen determination of Pflüger, which is widely used, consists in precipitating glycogen from tissue with alcohol after the treatment by strong alkali, then converting this into glucose by boiling it with hydrochloric acid and finally estimating the amount of resulted glucose by the usual method. But by this method some reducing substances other than glycogen, may intervene. Moreover, it was shown by Bierry and Gouzon (1928) that the alcohol precipitation is not complete when the amount of glycogen is relatively small.

Taking these misleading factors into consideration the author used the Takahata-Kume's methods after a slight modification, which runs as follows.

50–100 mg. of the Tawara's bundle (the right or left branch of His's bundle) was weighed out by means of the torsion balance into a graduated test tube containing 1 cc. of 30% sodiumhydroxide. After being placed 10 minutes in a boiling bath, the tube was transferred to the autoclav and submitted to the heating at the temperature of 120°C for 30 minutes. After being cooled, the content was neutralised with strong hydrochloric acid and further the excess of the acid was added so that the final concentration became 10 percent.

The whole was heated in a boiling water bath for 40 minutes, upon which the glycogen was completely hydrolysed into glucose. Cooled and neutralised with sodiumhydroxide, then 1 cc. of 12% tungstic acid solution and 1 cc. of $\frac{2}{3}$ N. sulphuric acid were added and the whole was made up to 10 cc. with distilled water. After it was well mixed, the precipitate was filtered off. Of the filtrate each 2 cc. was pipetted into 2 test tubes and added with 1 cc. of 30% sodiumhydroxide. The content in one of the tubes was neutralised at once with concentrated hydrochloric acid and that of another was subjected to heating in a boiling water bath for 30

minutes to decompose the glucose and after being cooled was neutralised exactly. Of the content of each tube the reduction power was determined by the method of Hagedorn and Jensen.

The former gives the value of total reduction and the latter that of the residual reduction, which is caused by other factors than glucose. By subtracting the second value from the first we get the reduction's power which is solely attributed to glucose derived from glycogen.

On the nature of the substances, which give rise to the rest reduction, the opinions of many investigators are not altogether concordant. Hagedorn and Jensen (1923) state that creatinine gives the reduction equal to 47–58% of glucose and uric acid about 53–58%. According to Becker the creatinine content of heart muscle is nearly 0.215–0.243% ; this, however, will be broken down by heating with alkali and, moreover, if it exists, is precipitated by tungstic acid.

The same fate can be traced with uric acid, so that in the procedures of glycogen determination as above mentioned the errors due to these substances can be excluded. The experimental result recorded in Table I gives the information in this connection in a convincing manner. The substance was treated exactly as the tissues in the main procedure.

TABLE I.
The negative rest reduction due to creatinine and uric acid.

Substances examined	CC. of N/200 thiosulfat solution used Hagedorn-Jensen	CC. of N/100 thiosulfat solution used Bang
Uric acid 1.0 mg.	2.00	1.98
Creatinine 1.0 mg.	1.96	1.96
Control	1.98	1.98

To the substances, which are responsible for the rest reduction other than creatinine and uric acid, might be enumerated the pro-

tein splitting products. It is important to see whether these products might change their reducing activities in the course of treatment with strong alkali in the later phase of the method. For this purpose egg albumin and casein were submitted to the examination. The procedure is quite the same as mentioned in the determination of glycogen, the tissue here simply being replaced with the protein.

TABLE II.
The rest reduction due to protein.

Protein	Total reduction in terms of glucose		Rest reduction in terms of glucose		Difference in terms of glucose	
	Hagedorn	Bang	Hagedorn	Bang	Hagedorn	Bang
5% Egg albumin						
2.0 cc.	0.174	0.175	0.139	0.128	0.035	0.047
1.5 cc.	0.129	0.111	0.108	0.093	0.021	0.018
10. cc.	0.090	0.071	0.072	0.043	0.018	0.028
Casein 50.0 mg.	0.273	0.200	0.255	0.175	0.018	0.025

The treatment with alkali brought about nearly 20% decrease with Hagedorn's method and a little more with Bang's. By the way, it is noted that there exist more sensitive substances in protein cleavages toward Hagedorn's method than Bang's. As the result of this experiment it is necessary to consider this slight decrease when this alkali treatment is applied to find out the rest reduction caused by the protein on the supposition that no glycogen is contained in protein molecule.

The fundamental point of this method whether glucose in the system can be destroyed completely by this treatment with alkali was verified again as the following table clearly shows.

After the above critical survey we can now conclude that Takahata and Kume's principle for the determination of the rest reduction can be used conveniently under adequate precaution.

TABLE III.
The destruction of glucose with the alkali treatment.

Glucose in mg.	Hagedorn cc. of N/200 thiosulfate solution	cc. of N/100 thiosulfate Bang solution
0.4	1.95	1.97
0.2	1.96	1.98
0.1	1.96	1.97
Control	1.97	1.99

Sampling.

The conducting system of dog and pig heart was found too small to permit the quantitative determination of its glycogen content, so that of the horse and the ox were used exclusively. After the animal was killed the heart was removed, put into a freezing bottle at once, brought back to the laboratory, and soon submitted to the experiment. The isolation of the bundle of Tawara was carried out after the descriptions of Tawara (1906) to avoid the contamination of heart muscle and some connecting tissues. In some instances, the preparation of the bundle was undertaken at the slaughter house. An aliquot portion was weighed out there and boiled in 30% alkali for 10 minutes, and the further procedure was continued in the laboratory.

The experimental results are indicated in Table IV.

The above analytical data show in an unmistakable manner that the glycogen content of the conducting system of both animals is far greater than that of the heart muscle. Moreover, in the author's experiment, the postulation of Baudze and Wertheimer that the glycogenolysis of the heart muscle of the ox proceeds much faster than that of the horse, could not be verified.

To measure the rate of glycogenolysis in the conducting bundle of His and Tawara is impossible, because, owing to the scarcity of the material, we can not follow the change with times on the

TABLE IV.
The glycogen content of the Tawara's bundle and heart muscle of ox

No. of Exptm.	No. of ox	Sort of muscle	Weight of muscle in mg.	Total reduc- tion in terms % of glucose	Rest reduct %	Glycogen %	Remarks
1	I	{ left Tawara heart m.	102	1.632	0.882	0.750	One hour in freezing bottle.
2	I	{ right Tawara heart m.	103	1.181	1.073	0.108	
3	II	{ left Tawara heart m.	69	1.594	0.920	0.674	4 hours in freezing bottle.
4	II	{ right Tawara heart m.	102	1.118	1.000	0.118	
5	II	{ left Tawara heart m.	86	1.913	0.907	1.006	One hour in freezing bottle.
6	II	{ right Tawara heart m.	91	1.670	1.044	0.626	
7	III	{ left Tawara heart m.	75	1.933	0.800	1.133	4 hours in freezing bottle.
8	III	{ right Tawara heart m.	95	1.516	1.047	0.468	
9	IV	{ left Tawara heart m.	89	1.899	0.803	1.096	4 hours in freezing bottle.
10	V	{ right Tawara heart m.	102	1.083	1.029	0.069	
11	VI	{ left Tawara heart m.	77	2.084	0.825	1.259	One hour in freezing bottle.
12	VI	{ right Tawara heart m.	99	1.707	1.192	0.515	
13	VII	{ left Tawara heart m.	67	1.559	0.716	0.843	3½ hours in freezing bottle.
14	VII	{ right Tawara heart m.	93	1.406	1.083	0.323	
15	VIII	{ left Tawara heart m.	84	1.500	0.982	0.518	7 hours in freezing bottle.
16	VIII	{ right Tawara heart m.	109	1.404	1.110	0.294	
17	IX	{ left Tawara heart m.	47	2.181	0.862	1.319	
18	X	{ right Tawara heart m.	106	1.453	0.991	0.462	¾ hour at 15°C
19	XI	{ left Tawara heart m.	67	1.589	0.799	0.790	
20	XI	{ right Tawara heart m.	83	1.506	1.078	0.428	1½ hour at 8°C
21	XII	{ left Tawara heart m.	52	1.933	0.990	0.943	
22	XII	{ right Tawara heart m.	71	1.753	1.112	0.641	1½ hour at 8°C
23	XIII	{ left Tawara heart m.	50	1.900	0.850	1.070	
24	XIII	{ right Tawara heart m.	71	1.289	0.958	0.331	3 hours at about 8°C

TABLE V.
The glycogen content of the Tawara's bundle of horse.

No. of Experm.	No. of horse	Sort of tissue	Weight of muscle in mg.	Total reduct in terms of glucose %	Rest reduct in terms of glucose %	Glycogen in terms of glucose %	Remarks
1	I	{ left Tawara heart m.	82	1.732	0.811	0.921	2 hours 10 min. in freezing bottle.
2	II	{ left Tawara heart m.	88 73	1.614 2.445	1.256 1.192	0.358 1.253	2 hours 10 min. in freezing bottle.
3	II	{ right Tawara heart m.	81 45 106	1.728 1.701 1.047	1.370 0.922 0.802	0.358 0.779 0.245	2 hours in freezing bottle.
4	III	{ left Tawara heart m.	66 86	2.030 1.448	0.970 1.009	1.061 0.448	2 ½ hours at 20°C. 2 hours in freezing bottle.
5	III	{ left Tawara heart m.	51 95	1.350 1.553	0.922 1.193	0.431 0.361	2 hours in freezing bottle.
6	IV	{ right Tawara left Tawara	72	2.347	1.924	1.423	1 ½ hour at 20°C.
7	IV	{ left Tawara spurious tendon	88 57	1.039 1.667	0.977 0.842	0.062 0.825	¾ hour at 5°C.
8	V	{ left Tawara left spurious tendon	79 59	1.525 1.614	1.101 0.873	0.424 0.771	1 ½ hour at 5°C.
9	V	{ heart m. right Tawara	89 54	1.343 2.208	1.140 0.833	0.203 1.435	¾ hour at 6°C.
10	VI	{ heart m. spurious tendon	78 44 81	1.603 1.943 1.308	1.160 0.784 0.963	0.443 1.159 0.345	1 ½ hour at 6°C. ¾ hour at 6°C.

same material. But it seems cogent to assume that there exists no pronounced difference between those in the bundle and the muscle.

With regard to the difference between the glycogen content of the bundles of both sides nothing definite can be said. But it seems true that the right Tawara's bundle contains a little larger amount of glycogen than the left. This might be caused by the fact that the former is relatively rich in muscle fiber and arm in connecting tissue.

Finally it should be noted that the rest reduction of heart muscle is usually greater than that of the conducting system. This does not, however, invalidate the conclusion at all.

DISCUSSION.

From the foregoing experiment, there is no room for doubt on the conclusion attained by Nagayo and Mönckeberg microscopically that the His and Tawara's bundle contains a far larger amount of glycogen than heart muscle. But as has already been referred to in the introduction, the physiological significance of this large glycogen content is difficult to explain. Since the glycogen is usually assumed as the source of the kinetic energy of muscle contraction, Pick (1924) put forward the idea that a more intense metabolic process takes place in the bundle. He considers also that a large content of oxydase as proved by Katsunuma may lend support in favour of his idea.

Lewis (1921) postulated that the glycogen content of Purkinje's fiber, auricle, ventricle and Tawara's node decrease in the order given, which is met again with the rate of conduction.

La Franca (1922) observed that when the heart beat was accelerated by the application of caffeine the glycogen content in the Keith-Flack's node decreased to a greater extent.

Though these investigations agree in correlating the greater glycogen content with the function of the Tawara's bundle, yet the experimental result which was obtained by the author and will be reported in the next communication does not persuade us

to accept the above view without hesitation. At any rate the significance of the glycogen in His and Tawara's bundle can not be given satisfactorily at present and awaits further investigation.

SUMMARIES.

1. The quantitative determination was made on the glycogen contents of the Tawara's bundle of horse and ox heart and compared with that of the heart muscle.

2. It was found that the former is far greater than the latter, thus leading to the conclusions that the microscopical results attained by Nagayo and others stand in agreement with those obtained by the chemical analysis.

The author desires to express his heartiest thanks to Professor Dr. Keizo Kodama for his kind advice throughout the course of the investigation and to Professor Dr. Makoto Ishihara for his kind suggestions.

REFERENCES.

- Becker (1913): *Z. f. Physik. Chem.* **87**, 21.
Best (1901): *Verhandl. d. Deutsch. Path. Gesell.* **4**, 108.
Bierry and Gouzon (1928): *Comp. Rend. de la Soc. d. Biol.* **99**, 186.
Buadze u. Wertheimer (1928): *Pflügers Archiv.* **219**, 233.
La Franca (1922): *Arch. intesnat. d. physiolog.* **17**, 266.
Hagedorn u. Jensen (1923): *Biochem. Zeitschr.* **137**, 92.
Ishihara and Nomura (1923): *Heart.* **10**, 339.
Katsunuma (1924): *Intracelluläre Oxydation u. Indophenolsynthese.* 115.
Lewis (1921): *Quart. Journ. of Med.* **14**, 339.
Nagayo (1908): *Chugai Ejishinshi.* **754**.
Nagayo u. Aschoff (1908): *Verhandl. d. Deutsch. Patholog. Gesell.* **12**, 150.
Neukirch (1910): *Zeitschr. f. klin. Med.* **70**, 251-256.
Pick (1924): *Klin. W.* **3**, Nr. 16, 662.
Romien (1927): *Comp. Rend. de la Soc. de Biol.* **96**, 1230.
Tawara (1906): *Das Reizleitungssystem des Säugetierheizens.*
Takahata u. Kume (1926): *Fukuoka Ikwadaigaku Zasshi.* **19**, Nr. 2, 169.

INDEX TO VOLUME X.

- A**ccetyl-derivate, Studien über die fermentative Spaltung der ———, Formyl, und Benzoylderivate der Aminosäuren. 207.
- Allantoin, Über das ——— in der Galle des Hundes. 435.
- Amidobenzoessäure, Über das Verhalten der ———n im Organismus der niederen Tiere. 189.
- Aminosäure, Studien über die fermentative Spaltung der Acetyl, Formyl, und Benzoylderivate der ———n. 207.
- , Über das Verhalten der lebenswichtigen ———n bei der Bebrütung des Meerschildkröteneies. 365.
- Animal body, Studies on the behavior of cholesterol within the ———. 45, 409.
- Antirachitis value, The influence of ultraviolet irradiation on the ——— of soybean oil. 177.
- ASAKAWA, Katsura. Über die Nierenglycerophosphatase. 157.
- Atropinglykämie, Die hemmende Wirkung der Splanchnicotomie auf die ———. 97.
- Auriculoventricular junctional system, Biochemical studies on the ——— of heart. 481.
- B**akterienentwicklung, Über das Wesen der Salzhydrolyse der Stärke betrachtet im Lichte der Salzwirkung auf die ———. 259.
- Bebrütung, Über das Verhalten der anorganischen Bestandteile bei der ——— des Meerschildkröteneies. 369.
- , Über das Verhalten der Fette bei der ——— von Meerschildkröteneiern. 375.
- , Über das Verhalten der Hexon- und Purinbasen, die während der ——— in freier Form im Hühnerei vorhanden sind. 451.
- , Über das Verhalten der lebenswichtigen Aminosäuren bei der ——— des Meerschildkröteneies. 365.
- , Über das Verhalten des im Reptilienei vorhandenen Reststickstoffes bei der ———. 357.
- , Über das Verhalten des Ovomukoides und Cholins bei der ——— des Meerschildkröteneies. 443.
- , Über die Bildung von d-Milchsäure bei der ——— von Meerschildkröteneiern. 361.
- Behavior of cholesterol, Studies on the ——— within the animal body. 45.
- Benzoylderivate, Über die Wirkung der proteolytischen Fermente auf die ——— und Desaminoderivate der Polypeptide. 277.
- , Studien über die fermentative Spaltung der Acetyl, Formyl, und ——— der Aminosäuren. 207.
- Bestandteile, Über das Verhalten der anorganischen ——— bei der Bebrütung des Meerschildkröteneies. 369.
- Bilirubinbildungsfähigkeit, Über die ——— der Hundemilch in vivo. 11.
- Biochemie, Zur Kenntnis der ver-

- gleichenden —, 198.
- Blausäure, Beiträge zur Wirkung des Insulins bei gleichzeitiger Anwendung von —, 383.
- Blood sugar, A new micromethod for the determination of —, 1.
- Blutammoniak, Über den experimentellen Versuch des —, 389.
- Blutzuckergehalt, Über den Einfluss des Ergotamin auf den —, 101.
- β -Steardipalmitins, Über das Vorkommen des — in der Rinderthymus. 183.
- Bufodesoxycholsäure, Über die (II). 5.
- C**arbohydrate metabolism, The — of the animal fed on a Vitamin C free diet. 17.
- Chicken, The fate of hippuric acid in the — organism. 457.
- Cholesterol, Studies on the behavior of — within the animal body. 45. 409.
- , The content of free and ester — in various tissues of normal rabbit. 409.
- , The influence of various autonomous nervous poisons on the content of — in each organ and tissue. 409.
- , the rôle of thyroid gland on the content of — in each organ and tissue. 409.
- Cholesterol estimation, A method recommendable for — in any kind of tissue. 45.
- Cholin, Über das Verhalten des Ovomukoides und —s bei der Bebrütung des Meerschildkröteneies. 443.
- d-Milchsäure, Über die Bildung von — bei der Bebrütung von Meerschildkröteneiern. 361.
- Desaminoderivate, Über die Wirkung der proteolytischen Fermente auf die Benzoyl- und — der Polypeptide. 277.
- Determination of blood sugar, A new micromethod for the —, 1.
- E**DA, Gen-ichiro. Über den Einfluss des Ergotamins auf den Blutzuckergehalt. 101.
- Elektrolyten, Über die Wirkung der — auf die Glycerophosphatase. 395.
- Embryochemie, Beiträge zur — der Reptilien. 351.
- Epidermis, Über die chemische Zusammensetzung der menschlichen —. 311.
- Ergotamin, Über den Einfluss des —s auf den Blutzuckergehalt. 101.
- F**ate, The — of hippuric acid in the chicken organism. 457.
- Fermente, Über die Wirkung der proteolytischen — auf die Benzoyl- und Desamino-derivate der Polypeptide. 277.
- , Über — im Meerschildkrötenei. 379.
- Fette, Über das Verhalten der — bei der Bebrütung von Meerschildkröteneiern. 375.
- Formylderivate, Studien über die fermentative, Spaltung der Acetyl-, — und Benzoylderivate der

- Aminosäuren. 207.
- G**alle, Über das Allantoin in der — des Hundes. 435.
- Glycerophosphatase, Über die Wirkung der Elektrolyten auf die —. 395.
- Glycogen, The — content. 481.
- Glyzerophosphatase, Die Kataphorese der —. 147.
- , Die pH-Abhängigkeit der —. 133.
- H**art, Biochemical studies on the auriculoventricular junctional system of —. 481.
- Hematoporphyrin, Studies on the — hemolysis. 325.
- Hexonbase, Über das Verhalten der — und Purinbasen, die während der Bebrütung in freier Form im Hühnerei vorhanden sind. 451.
- Hippuric acid, The fate of — in the chicken organism. 457.
- HIROHATA, Ryozo. Studies on protamine. (I). 251.
- HOSoya, Nobuo. Beiträge zur Wirkung des Insulin bei gleichzeitiger Anwendung von Blausäure. 383.
- Hühnerei, Über das Verhalten der Hexon, und Purinbasen, die während der Bebrütung in freier Form im — vorhanden sind. 451.
- Hund, Über das Allantoin in der Galle des —es. 435.
- Hundemilz, Über die Bilirubinbildungsfähigkeit der — in vivo. 11.
- HURUYA, Atsusi. Studies on the phosphorus intoxication of rabbits. 63.
- Hydrogen-ion, On the influence of — concentration upon the inactivation of urease by some heavy metal salts. 197.
- I**NOUE, Kentaro. Die pH-Abhängigkeit der Glyzero-phosphatase. 133.
- , Über die Wirkung der Elektrolyten auf die Glycerophosphatase. 395.
- Insulin, Beiträge zur Wirkung des —s bei gleichzeitiger Anwendung von Blausäure. 383.
- IWANAGA, Yoshio und KAWASHIMA, Shin-ichi, Die hemmende Wirkung der Splanchnicotomie auf die Atropinglykämie. 97.
- IWAO, Chuji; KOMORI, Yutaka, u. NAKAMURA, Hideo, Über die Bilirubinbildungsfähigkeit der Hundemilz in vivo. 11.
- IZUME, Seiichi; YOSHIMARU, Yoshinori and KOMATSUBARA, Isao. Studies on experimental ricket. II. The influence of ultra-violet irradiation on the antirachitic value of soybean oil. 177.
- J**ono, Yutaka. Über die chemische Zusammensetzung der menschlichen Epidermis. 311.
- K**AMEI, Terumi. Zur Kenntnis der Vergleichenden Biochemie. IV. Über das Verhalten der Amidobenzoessäuren im Organismus der niederen Tiere. 189.
- KARASHIMA, Junji. Über das Verhalten der anorganischen Be-

- standteile bei der Bebrütung des Meerschildkröteneies. 369.
- KARASHIMA, Junji. Über das Verhalten der Fette bei der Bebrütung von Meerschildkröteneiern. 375.
- . Über das Vorkommen des β -Stearodipalmitins in der Rinderthymus. 183.
- KARAZAWA, Sugizo. Über den experimentellen Versuch des Blut-ammoniaks. 389.
- Kataphorese, Die — der Glyzerophosphatase. 147.
- KAWAI, Hashime. Studies on the hematorporphyrin hemolysis. 325.
- KAWAI, Tsutomu. Über die Wirkung der proteolytischen Fermente auf die Benzoyl- und Desamino-derivate der Polypeptide. 277.
- KAWASHIMA, Shin-ichi u. IWANAGA, Yoshio. Die hemmende Wirkung der Splanchnicofomie auf die Atrotinglykämie. 97.
- KIMURA, Hideo. Studien über die fermentative Spaltung der Acetyl-, Formyl-, und Benzoylderivate der Aminosäuren. 207.
- KITAGAWA, Matsunosuke. On the influence of hydrogen-ion concentration upon the inactivation of urease by some heavy metal salt. 197.
- KOBAYASHI, Hideo. Die Kataphorese der Glycerophosphatase. 147.
- KODAMA, Keizo and OGAWA, Iwao. A new micro-method for the determination of blood sugar. 1.
- KOMATSUBARA, Isao; YOSHIMASU, Yoshinori and IZUME, Seiichi. Studies on experimental rickets. II. The influence of ultraviolet irradiation on the antirachitic value of soybean oil. 177.
- KOMORI, Yutaka; IWAO, Chuji und NAKAMURA, Hideo. Über die Bilirubinbildungsfähigkeit der Hundemilch in vivo. 11.
- M**ACHIDA, Hikosaburo; NAGAYAMA, Takeyoshi and TAKEDA, Yoshio. Studies in experimental scurvy. II. The carbohydrate metabolism of the animal fed on a Vitamin C free diet. 17.
- Meerschildkrötenei, Über Fermente im —. 379.
- , Über das Verhalten der Fette bei der Bebrütung von —-ern. 375.
- , Über die Bildung von d-Milchsäure bei der Bebrütung von —-ern. 36.
- Meerschildkrötenei, Über das Verhalten der anorganischen Bestandteile bei der Bebrütung des —-es. 369.
- , Über das Verhalten der lebenswichtigen Aminosäuren bei der Bebrütung des —-es. 365.
- , Über das Verhalten des Ovomukoides und Cholins bei der Bebrütung des —-es. 443.
- Metabolism, The nitrogen — of the animal fed on a Vitamin C free diet. 27.
- Micro-method, A new — — for the determination of blood sugar. 1.
- N**AGAYAMA, Takeyoshi; MACHIDA, Hikosaburo and TAKEDA, Yoshio. Studies in experimental scurvy. II. The carbohydrate meta-

- bolism of the animal fed on a Vitamin C free diet. 17.
- , and SATO, Noboru. Studies in experimental scurvy. III. The nitrogen metabolism of the animal fed on a Vitamin C free diet. 27.
- NAKAMURA, Hideo; KOMORI, Yutaka u. IWAO, Chuji. Über die Bilirubinbildungsfähigkeit der Hundemilz in vivo. 11.
- NAKAMURA, Yasuo. Über das Verhalten des im Reptilienei vorhandenen Reststickstoffes bei der Bebrütung. 357.
- Nervous poisons, The influence of various autonomous — on the content of cholesterol in each organ and tissue. 409.
- Nierenglycerophosphatase, Über die — . 157.
- Nitrogen metabolism, The — of the animal fed on a Vitamin C free diet. 27.
- OGAWA, Iwao, and KODAMA, Keizo. A new micro-method for the determination of blood sugar. 1.
- Oil, The influence of ultraviolet irradiation on the antirachitic value of soybean —. 177.
- OKAMURA, Takeji. Über die Bufodexocholsäure. (II) 5.
- OKUYAMA, Daisaburo. Studies on tyrosinase. I. The oxidation and reduction potential of the tyrosinase system. 463.
- ONIZAWA, Jinye, Studies on the behavior of cholesterol within the animal body. I. A method recommendable for cholesterol estimation in any kind of tissue. 45.
- , II. The content of free and ester cholesterol in various tissues of normal rabbit. 409.
- . III. The influence of various autonomous nerve poisons on the content of cholesterol in each organ and tissue. 413.
- , IV. The rôle of thyroid gland on the content of cholesterol in each organ and tissues. 425.
- Organ, the influence of various autonomous nervous poisons on the content of cholesterol in each — and tissue. 413.
- . The rôle of thyroid gland on the content of cholesterol in each — and tissue. 415.
- Ovomukoid, Über das Verhalten des —s und Cholins bei der Bebrütung des Meerschildkröteneies. 443.
- Oxidation, The — and reduction potential of the tyrosinase system. 463.
- pH-Abhängigkeit, Die — — der Glycerophosphatase. 133.
- Phosphorus intoxication, Studies on the — — of rabbits. 63.
- Poison, The influence of various autonomous nervous —s on the content of cholesterol in each organ and tissue. 409.
- Polypeptide, Über die Wirkung der proteolytischen Fermente auf die Benzoyl- und Desaminoderivate der —. 277.
- Protamine, Studies on —(1). 231.
- Purinbasen, Über das Verhalten der Hexon- und —, die während der Bebrütung in freier Form im

- Hühnerei vorhanden sind. 451.
- Q**uinhydrone, On the influence of the ammonium ion on the — electrode potential. 115.
- R**abbit, Studies on the phosphorus intoxication of —s. 63.
- , The content of free and ester cholesterol in various tissues of normal —. 409.
- Reptilien, Beiträge zur Embryochemie der —. 351.
- Reptilienei, Über das Verhalten des im — vorhandenen Reststickstoffes bei der Bebrütung. 357.
- Reststickstoff, Über das Verhalten des im Reptilienei vorhandenen —es bei der Bebrütung. 357.
- Rickets, Studies on experimental —. 177.
- Rinderthymus, Über das Vorkommen des β -Stearodipalmitins in der —. 183.
- S**AGARA, Jun-ichiro, Über Fermente im Meerschildkrötenei. 379.
- Salt, On the influence of hydrogen-ion concentration upon the inactivation of urease by some heavy metal —s. 197.
- Salzhydrolyse, Über das Wesen der — der Stärke betrachtet im Lichte der Salzwirkung auf die Bakterienentwicklung. 259.
- Salzwirkung, Über das Wesen der Salzhydrolyse der Stärke betrachtet im Lichte der — auf die Bakterienentwicklung. 259.
- SATO, Noboru; NAGAYAMA, Takeyoshi. Studies in experimental scurvy. III. The nitrogen metabolism of the animal fed on a Vitamin C free diet. 27.
- Scurvy, Studies in experimental —. 17, 27.
- SENDJU, Yuzo. Über das Verhalten der lebenswichtigen Aminosäuren bei der Bebrütung des Meerschildkröteneies. 365.
- , Über die Bildung von d-Milchsäure bei der Bebrütung von Meerschildkröteneiern. 361.
- SHIKATA, Masuzo und TACHI, Isamu. On the influence of the ammonium ion on the quinhydrone electrode potential. 115.
- Soybean, The influence of ultraviolet irradiation on the antirachitic value of — oil. 177.
- Spaltung, Studien über die fermentative — der Acetyl-, Formyl-, und Benzoyl derivate der Aminosäuren. 225.
- Splanchnicotomie, Die hemmende Wirkung der — auf die Atropinglykämie. 97.
- Stärke, Über das Wesen der Salzhydrolyse der — betrachtet im Lichte der Salzwirkung auf die Bakterienentwicklung. 259.
- T**ACHI, Isamu und SHIKATA, Masuzo. On the influence of the ammonium ion on the quinhydrone electrode potential. 115.
- TAKAHASHI, Masao. The fate of hippuric acid in the chicken organism. 457.
- , Über das Verhalten des Ovomukoides und Cholins bei der Bebrütung des Meerschildkröteneies. 443.
- , Über das Verhalten des Hexon

- und Purinbasen, die während der Bebrütung in freier Form im Hühnerei vorhanden sind. 451.
- TAKEDA, Yoshio; MACHIDA, Hikosaburo, NAGAYAMA, Takeyoshi. Studies in experimental scurvy. II. The carbohydrate metabolism of the animal fed on a Vitamin C free diet. 17.
- Thyroid gland, The rôle of ——— on the content of cholesterol in each organ and tissue. 409.
- Tiere, Über das Verhalten der Amidobenzoessäuren im Organismus der niederen ———. 189.
- Tissus, A method recommendable for cholesterol estimation in any kind of ———. 45.
- , The content of free and ester cholesterol in various ———s of normal rabbit. 409.
- , The influence of various autonomous nervous poisons on the content of cholesterol in each organ and ———. 413.
- , The rôle of thyroid gland on the content of cholesterol in each organ and ———. 425.
- TOMITA, Masaji. Beiträge zur Embryochemie der Peptilien. 351.
- Tyrosinase, Studies on ———. 463.
- Tyrosinase System, The oxidation and reduction potential of the ———. 463.
- Ultraviolet irradiation, The influence of ——— on the antirachitic value or soybean oil. 177.
- Urease, On the influence of hydrogen-ion concentration upon the inactivation of ——— by some heavy metal salts. 197.
- Vitamin C, The carbohydrate metabolism of the animal fed on a ——— — free diet. 17.
- , The nitrogen metabolism of the animal fed on a ——— — free diet. 27.
- Wesen, Über das ——— der Salzhydrolyse der Stärke betrachtet im Lichte der Salzwirkung auf die Bakterienentwicklung. 259.
- YAMAZAKI, Kageyu. Biochemical studies on the auriculoventricular functional system of heart. I. The glycogen content. 481.
- YASUDA, Morio. Über das Wesen der Salzhydrolyse der Stärke betrachtet im Lichte der Salzwirkung auf die Bakterienentwicklung. 259.
- YOSHIMURA, Shigeo, Über das Allantoin in der Galle des Hundes. 435.
- YOSHIMASU, Yoshinori; KOMATSUBARA, Isao and IZUME, Seiichi. Studies on experimental rickets. II. The influence of ultraviolet irradiation on the antirachitic value of soybean oil. 177.
- Zusammensetzung, Über die chemische ——— der menschlichen Epidermis. 311.

